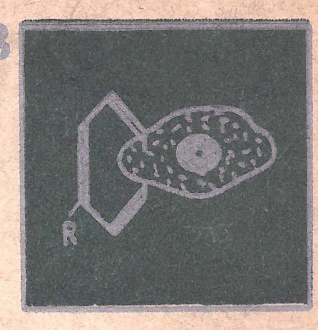
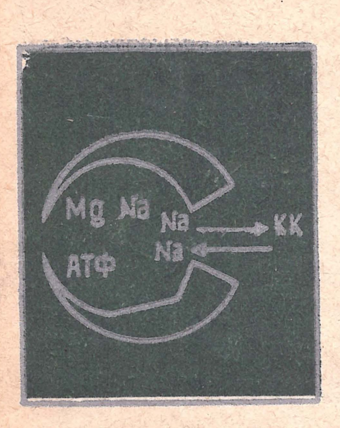
Транспорт ионов

# Транспорт ионов через биологические мембраны и механизм действия физиологически активных веществ



АКАДЕМИЯ НАУК УЗБЕКСКОЙ ССР
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ

# ТРАНСПОРТ ИОНОВ ЧЕРЕЗ БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Под редакцией члена-корреспондента
АН УзССР *Б. А. Ташмухамедова*

ТАШКЕНТ · ИЗДАТЕЛЬСТВО «ФАН» УЗБЕКСКОЙ ССР · 1982

УДК 577.11

**Транспорт ионов через биологические мембраны и механизм действия физиологически активных веществ.** Ташкент, «Фан» УзССР, 1980, с.— 232.

В сборнике отражены результаты исследования структуры и функций биологических мембран и специфических мембранных образований, влияния различных физиологически активных соединений на транспорт ионов через мембраны. Биологические мембраны и их физико-химическое состояние определяют большинство клеточных функций. Состояние мембран регулирует возбудимость клеток, определяет энергетику клетки, ионный состав, мышечное сокращение и т. д. Реализация эффектов многих биологически активных веществ осуществляется через взаимодействие их с мембранами или специфическими мембранными образованиями.

Для биологов, химиков и медиков.

Рецензенты: докт. биол. наук *А. К. Мирахмедов,* докт. биол. наук *К. Р. Рахимов*

Т $\frac{21055-1690}{М 355 (04)-81}$ 51—82 2001040000

## ПРЕДИСЛОВИЕ

Исследование механизмов активного транспорта ионов через биологические мембраны — одна из проблем, от успешного решения которой в значительной степени зависят многие теоретические и прикладные направления современной биологии и медицины. Мембраны занимают центральное место в регуляции клеточных функций. Поддержание нормальной клеточной асимметрии между клеткой и средой обеспечивается работой ионных насосов, локализованных в плазматических (Na, K-АТФаза и Ca-АТФаза) и внутриклеточных мембранах (кальциевые насосы митохондрий и эндоплазматического ретикулума). Функционирование ионных насосов регулируется различными факторами, среди которых следует отметить гормоны, метаболиты, некоторые ионы, эволюционно обусловленные особенности минерального обмена и т. д. Необходимо, однако, подчеркнуть, что многообразные способы и механизмы регуляции активности ионных насосов исследованы недостаточно, хотя эти аспекты универсального явления транспорта ионов представляют не меньший интерес, чем выяснение молекулярного устройства ионных насосов в живой клетке.

Наряду с регуляцией ионного баланса на уровне отдельных клеток и клеточных органелл транспорт ионов и водно-солевая регуляция в пределах целого организма у позвоночных осуществляются специализированным органом — почкой. Исследование транспорта ионов в клетках нефрона представляет значительный интерес в связи с тем, что его сегменты обладают различной функциональной активностью, которая находит отражение в кинетических и термодинамических характеристиках систем активного транспорта $Na^+$ и $K^+$. Кроме того, существенным критерием, определяющим особенности функционирования Na, K — насоса в нефроне, являются видовые и экологические характеристики минерального обмена различных животных.

Неясным в настоящее время представляется комплекс физиологических систем и механизмов, регулирующих внутриклеточный уровень $Ca^{2+}$. Известно, что ионы $Ca^{2+}$ участвуют в качестве вторичного посредника, активатора или ингибитора в осуществлении

многочисленных клеточных процессов и реакций. На пути идентификации механизмов, контролирующих обмен ионов $Ca^{2+}$ в клетке, большое значение придается исследованиям действия различных физиологически активных соединений, способных модифицировать активность систем аккумуляции и высвобождения $Ca^{2+}$, локализованных в мембранах митохондрий или эндоплазматического ретикулума.

В настоящее время разработаны определенные экспериментальные подходы, позволяющие установить молекулярную организацию и механизмы регуляции активности ионных насосов биологических мембран. Среди них прежде всего следует отметить различные методы разделения и последующей реконструкции систем транспорта ионов, широкое использование селективных ионофоров, токсинов и фосфолипаз. В исследовании Na, K-насоса важную роль играет применение сердечных гликозидов и родственных соединений, избирательно блокирующих транспортный фермент.

Поиск и характеристика новых эффективных «инструментов» исследования биологических мембран, способных обеспечить прогресс многих научных и прикладных дисциплин, является актуальной задачей современной мембранологии. Успехи в этом направлении несомненны (см. Ю. А. Овчинников, В. Т. Иванов, А. М. Шкроб — «Мембрано-активные комплексоны», 1974; Ю. А. Овчинников (ред.) — «Итоги и перспективы развития биоорганической химии и молекулярной биологии», 1978). В русле этих исследований находится оригинальное научное направление, сложившееся в нашей республике с середины 60-х годов на стыке мембранологии, физиологии и биоорганической химии. В отделе биофизики Института биохимии АН УзССР и в ТашГУ им. В. И. Ленина интенсивно исследуется проблема активного транспорта ионов через различные типы биологических мембран, осуществляется выделение функционально значимых компонентов мембран и реконструкция ионных насосов, большое внимание уделяется выяснению механизмов регуляции систем транспорта ионов. Широкую известность приобрели достижения научных коллективов республики, связанные с поиском, выделением и характеристикой свойств новых «инструментов» исследования: избирательно действующих зоо- и фитотоксинов, различных фосфолипаз, синтетических и природных ионофоров, сердечных гликозидов и т. д.

В настоящем сборнике представлены обзоры, отражающие основные успехи и перспективы развития биофизического направления исследований в Узбекистане. Книга представляет интерес для специалистов в области биофизики и биохимии ионного транспорта, физиологии клеточных процессов, механизма действия биологически активных соединений. Сборник рассчитан на научных работников, преподавателей вузов и аспирантов.

Чл.-корр. АН УзССР *Б. А. Ташмухамедов.*

# ТРАНСПОРТ ИОНОВ ЧЕРЕЗ БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ И ЕГО РЕГУЛЯЦИЯ

А. И. ГАГЕЛЬГАНС, Б. А. ТАШМУХАМЕДОВ, Х. МАМАТКУЛОВ

## МЕХАНИЗМ ИОННОЙ СЕЛЕКТИВНОСТИ КАЛЬЦИЕВЫХ НАСОСОВ КЛЕТОК ЖИВОТНЫХ ТКАНЕЙ И ОСОБЕННОСТИ ТРАНСПОРТА ИОНОВ СТРОНЦИЯ ЧЕРЕЗ БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ

Исследование механизма транспорта ионов через биологические мембраны и систем его регуляции — одна из наиболее актуальных проблем современной биохимии, биофизики и биологии в целом. Поддержание внутренней ионной среды клеток, отличающейся по составу от внеклеточного пространства,— общебиологическое явление. Активный транспорт ионов присущ клеткам бактерий, простейших, одноклеточных и многоклеточных водорослей, высших растений и животных. Неравномерное распределение ионов, их активное и пассивное перемещение между клеткой и средой, а также между различными клеточными элементами представляет собой важное звено в регуляции функционального состояния клеток различных тканей.

Особое место в интегральной системе клеточных механизмов, регулирующих ионный состав, занимает митохондриальный транспорт ионов, интенсивно исследующийся в течение последних 20 лет. Вывод о важной роли митохондрий в регуляции ионного гомеостаза клеток следует из детального анализа многочисленных экспериментальных данных, приведенных в ряде исчерпывающих обзоров (Lehninger, 1966, 1970, 1972; Rasmussen, 1966; Lehninger et al., 1967; Moore, 1972; Carafoli, 1973, 1974, 1975, 1977, 1979; Bygrave, 1977) и специальных монографий (Ленинджер, 1966; Скулачев, 1969, 1972; Ташмухамедов, Гагельганс, 1973; Овчинников, Иванов, Шкроб, 1974). В основе таких представлений лежит обнаруженная в начале 60-х годов способность изолированных митохондрий эффективно аккумулировать ионы двухвалентных металлов, калия и натрия, различные анионы и т. д. и анализ этого феномена.

Большое число работ по митохондриальному транспорту ионов посвящено исследованию механизмов аккумуляции и высвобождения ионов $Ca^{2+}$, являющихся компонентом множества функциональных и регуляторных систем клетки. Предполагается, что митохондриальный механизм транспорта $Ca^{2+}$ является первичным среди механизмов, используемых клеткой в процессе эволюции для модификации внутриклеточного распределения этого катиона

(Bygrave, 1977). Подобная модификация, или регуляция, может быть связана, в свою очередь, с длительными или преходящими изменениями в клеточном метаболизме.

Исследование транспорта $Ca^{2+}$ в митохондриях может быть разделено на несколько этапов (Bygrave, 1977; Carafoli, 1979). На первом этапе не придавалось должного внимания явлению аккумуляции $Ca^{2+}$ в митохондриях. Среди наиболее ранних работ этого периода следует отметить исследование Slater, Cleland (1953), которые обнаружили аккумуляцию $Ca^{2+}$ в митохондриях, но сочли несущественной ее биологическую роль, так как она наблюдалась и при 0°С. Несколько ранее было показано, что $Ca^{2+}$ может стимулировать АТФазную активность интактных митохондрий (Potter, 1947; Siekevitz, Potter, 1953; Potter et al., 1953) и что эти ионы обладают способностью разобщать окисление и фосфорилирование (Lehninger, 1949). Позднее появились работы, свидетельствующие о накоплении в изолированных митохондриях двухвалентных катионов против концентрационного градиента с помощью энергозависимого процесса (Bartley, Amoore, 1958), о стимулирующем эффекте $Ca^{2+}$ на дыхание (митохондрий, продемонстрированном при полярографической регистрации дыхания (Чанс, 1962).

На втором этапе получены прямые доказательства «массивного» накопления $Ca^{2+}$ в изолированных митохондриях почки (Vasington, Murphy, 1962). Внимание биоэнергетиков в этот период было сосредоточено на подборе условий, способствующих максимальной «нагрузке» митохондрий ионами кальция (Lehninger, 1966; Rasmussen, 1966). Электронномикроскопические исследования «нагруженных» таким образом митохондрий позволили выявить наличие в их матриксе электронноплотных гранул, которые были идентифицированы по химическому составу как гидроксиапатит, или фосфат кальция (Lehninger, 1970). Подобная «массивная» аккумуляция ионов кальция получила название «нагрузки матрикса» (Lehninger et al., 1969; Lehninger, 1970). В этот же период была установлена способность изолированных митохондрий накапливать с помощью аналогичного механизма значительное количество стронция (Mraz, 1962; Carafoli et al., 1965; Carafoli, 1965a, b; Van der Kloot, Glovsky, 1965; Caplan, Carafoli, 1965), марганца (Chappell et al., 1963; Chance, Mela, 1966; Drahota et al., 1969), а также магния — в случае митохондрий сердца (Brierley et al., 1963).

В исследованиях этого периода (Виноградов, Евтодиенко, 1967) помимо выяснения селективности митохондриального механизма транспорта двухвалентных катионов существенное внимание уделялось установлению места и роли процесса транспорта ионов в системе других эндэргонических функций митохондрий (синтез АТФ, обратный перенос электронов, трансгидрогеназная реакция и т. д.). В связи с тем, что разобщающие агенты и ингибиторы дыхания в равной мере влияли как на транспорт двухва-

лентных катионов, так и на окислительное фосфорилирование, было признано, что оба процесса поддерживаются одним и тем же звеном или одним и тем же состоянием, генерируемым в митохондриях (Chance, 1965; Rasmussen, 1966). Значительные усилия исследователей на этом этапе были направлены на измерение стехиометрических коэффициентов, характеризующих транспорт ионов в митохондриях, и анализ причин расхождений в их величинах, полученных в различных лабораториях. Эти несоответствия наблюдаются в исследованиях последнего времени, в частности при измерении стехиометрии переноса электрических зарядов в процессе транспорта $Ca^{2+}$ (Azzone et al., 1977; Reynafarje, Lehninger, 1977; Moyle, Mitchell, 1977; Akerman, 1978; Carafoli, 1979; Deana et al., 1979).

На третьем этапе исследования транспорта $Ca^{2+}$ в митохондриях, охватывающем и настоящий период, анализируется его механизм преимущественно в условиях «ограниченной» нагрузки или так называемой «нагрузки мембран». Эти исследования подтвердили предположение о наличии в митохондриях мобильного кальциевого переносчика (Lehninger, 1970; Bygrave, 1977), были обнаружены специфические ингибиторы транспорта двухвалентных катионов, каковыми являются лантаниды (Mela, 1968), комплексные катионы рутениевый красный (Moore, 1971) и гексаминокобальт (Tashmukhamedov, Gagelgans et al., 1972), взаимодействующие с гликопротеидами или мукополисахаридами. Одновременно было доказано, что митохондриальный транспорт двухвалентных катионов может быть описан в рамках хемиосмотической теории Митчела (Mitchell, 1966): ионы аккумулируются в митохондриях за счет электрохимического потенциала, генерируемого на внутренней мембране дыхательной цепью или $H^+$-АТФазой, и распределяются на внутренней мембране, достигая равновесия с ним (Lehninger, 1970; Скулачев, 1972). В 70-е годы были предприняты попытки разделения и последующей реконструкции на модельных системах (бислои, липосомы) митохондриальной системы транспорта $Ca^{2+}$ (Shamoo, Goldstein, 1977). Эта проблема, однако, не разрешена и до настоящего времени.

В современных исследованиях транспорта $Ca^{2+}$ в митохондриях большое внимание уделяется анализу механизмов регуляции не только входа $Ca^{2+}$ в митохондрии, но и систем его выхода, выяснению физиологической сущности этого процесса, соотношения активностей двух противоположно направленных потоков $Ca^{2+}$, идущих через внутреннюю мембрану митохондрий, особенностей электрофоретической и электронейтральной систем переноса $Ca^{2+}$ в различных тканях. Итогом этих исследований явилась разработка Carafoli (1979) концепции «кальциевого цикла», соединившей воедино путь электрофоретического переноса $Ca^{2+}$ внутрь митохондрий и электронейтральный обмен $Ca^{2+}/H^+$ (или обмена $Ca^{2+}/Na^+$ в митохондриях возбудимых тканей) как взаимосвязанный физиологически регулируемый механизм. Измене-

ние активности любого из «полуциклов» (соответственно отражающего путь входа $Ca^{2+}$ или его выхода) позволяет тонко регулировать внутри- и внемитохондриальную концентрацию $Ca^{2+}$. Наличие подобного цикла было описано и в некоторых ранних исследованиях (Ташмухамедов, Гагельганс, 1973; Drahota et al., 1965; Lehninger, 1966). Следует отметить, что присутствие в митохондриях более одной системы переноса $Ca^{2+}$ через внутреннюю мембрану несколько усложняет проблему их разделения и реконструкции.

Существует несколько механизмов тонкой регуляции уровня и распределения в клетке $Ca^{2+}$ (Ташмухамедов, Гагельганс, 1973), участвующего в качестве регулятора во многих биологических процессах (мышечное сокращение, секреция, фоторецепция и т. д.), активатора или ингибитора ряда ферментов, «мессенджера» некоторых сложных регуляторных цепей (например, система регуляции уровня цАМФ). Кроме механизма транспорта $Ca^{2+}$ в митохондриях, имеются «кальциевые насосы» в плазматических мембранах и в мембранах саркоплазматического ретикулума, которые, по-видимому, действуют параллельно с митохондриальным механизмом, обеспечивая внутриклеточный гомеостаз $Ca^{2+}$. Помимо насосов, локализованных в мембранах, имеются немембранные лиганды, выполняющие роль внутриклеточных «кальциевых буферов» (адениннуклеотиды, тропонин С, парвальбумины, фосфат, органические кислоты и т. д.). В частности, связывание $Ca^{2+}$ с немембранными компонентами обеспечивает концентрацию свободного $Ca^{2+}$ ($1 \cdot 10^{-6}$—$1 \cdot 10^{-7}$ М/л), которая существенно ниже уровня общего $Ca^{2+}$ в цитозоле. В последнее время выявлена еще одна функция цитоплазматических кальцийсвязывающих белков, заключающаяся в непосредственной регуляции активности АТФ-зависимых кальциевых насосов плазматической мембраны и саркоплазматического ретикулума.

Представляет интерес сопоставление двух типов кальциевых насосов, которыми располагают внутриклеточные депо кальция (митохондрии и саркоплазматический ретикулум). В основе $Ca^{2+}$-насоса ФСР лежит $Ca^{2+}$-активируемая АТФаза (Hasselbach, Makinose, 1961; 1962, 1963; Хассельбах, Вебер, 1964; Бендол, 1970; Ташмухамедов, Гагельганс, 1973; Ритов, 1977; Болдырев, 1977). Встраивание очищенной Са-АТФазы, выделенной из ФСР, в мембраны липосом из фосфолипидов сои оказалось единственным и достаточным условием успешной реконструкции механизма транспорта $Ca^{2+}$ (Racker, 1972).

В отличие от митохондрий, поляризация мембран ФСР не играет существенной роли в движении $Ca^{2+}$ через мембрану или же сам факт поляризации признается спорным (Болдырев, 1977; Beeler, Martonosi, 1979). Об этом же свидетельствуют отсутствие эффекта разобщителей-протонофоров типа ДНФ, ТТФБ, FCCP на количество аккумулированного в ФСР кальция (Ташмухамедов, Гагельганс, 1973; Madeira, 1978). Накопленный в ФСР или

в реконструированных протеолипосомах кальций высвобождается в среду при добавлении кальциевых ионофоров А 23187 и Х-537 А (Caswell, Pressman, 1972; Racker, 1972; Madeira, 1978), т. е. аналогично тому, как эти соединения действуют в митохондриях. Вместе с тем показано, что перенос $Ca^{2+}$ через мембрану ФСР или протеолипосом со встроенной Са-АТФазой генерирует разность потенциалов на мембране со знаком «плюс» внутри везикул, т. е. механизм транспорта $Ca^{2+}$ является электрогенным (Zimniak, Racker, 1978; Печатников и др., 1979). По данным других авторов (Beeler, Martonosi, 1979), прямых доказательств электрогенности транспорта $Ca^{2+}$ в ФСР нет, и электронейтральность этого процесса в целом обеспечивается одновременным с переносом $Ca^{2+}$ поглощением анионов или противотранспортом $Mg^{2+}$ (или других катионов). Селективный канал для $Ca^{2+}$, который «пронизывает» фосфолипидный бислой мембраны ФСР, видимо, является составной частью Са-АТФазы и может быть выявлен при встраивании триптического фрагмента этого фермента в бислойные фосфолипидные мембраны (Shamoo, Goldstein, 1977).

Транспорт ионов кальция в митохондриях осуществляется против концентрационного градиента, но по электрохимическому потенциалу, который генерируется на внутренней мембране дыхательной цепью или $H^{+}$-АТФазой. АТФ-зависимый перенос $Ca^{2+}$ внутрь фрагментов ретикулума идет не только против концентрационного градиента, но и против электрохимического потенциала, т. е. является истинно активным транспортом. В результате активной аккумуляции $Ca^{2+}$ его концентрация внутри везикул ретикулума повышается примерно в 1000 раз по сравнению с окружающей средой, где концентрация $Ca^{2+}$ понижается до $1 \cdot 10^{-7}$—$1 \cdot 10^{-6}$ М (Ташмухамедов, Гагельганс, 1973; Ритов, 1977; Болдырев, 1977), т. е. ниже пороговых величин мышечного расслабления. Расщепление АТФ и транспорт $Ca^{2+}$ протекают одновременно и в одинаковой степени зависят от pCa в инкубационной среде (Hasselbach, 1964). В то же время эти процессы могут зависеть от уровня уже связанного в везикулах кальция (Weber et al., 1966).

Кальциевый насос плазматических мембран, основой которого также является Са-АТФаза, имеет много общего с системой транспорта $Ca^{2+}$ в ФСР (Ташмухамедов, Гагельганс, 1973). Более того, активность обоих насосов модулируется специальными физиологическими регуляторами, которыми являются цитоплазматические кальцийсвязывающие белки, получившие название «кальмодулинов». В частности, белок-регулятор, выделенный из гемолизата эритроцитов человека, активировал транспорт $Ca^{2+}$ не только через мембрану эритроцитов, но и в ФСР скелетной мышцы кролика. Кальмодулин из саркоплазмы также был активен в обоих системах (Philipson, Baumgartner, 1979). Подобный «перекрест», несомненно, свидетельствует о большом сходстве систем

активного транспорта $Ca^{2+}$ через плазматические мембраны и мембраны ФСР и их регуляции.

Как и при изучении транспорта $Ca^{2+}$ в митохондриях, основное внимание исследователей в области аккумуляции $Ca^{2+}$ в ФСР уделялось преимущественно выяснению закономерностей, характеризующих аккумуляцию, или вход этого катиона в цистерны ретикулума, вопросам стехиометрии транспорта, сопряжения гидролиза АТФ с механизмом аккумуляции $Ca^{2+}$, механизму гидролиза АТФ, катализируемого Са-АТФазой, реконструкции системы транспорта $Ca^{2+}$ и регуляции ее активности в физиологических условиях (Martonosi, 1972; Ритов, 1977; Болдырев, 1977). Меньше изучены механизмы, управляющие выходом $Ca^{2+}$ из ретикулума, хотя не вызывает сомнения реальность этого процесса в живой клетке и его важность для отправления многих клеточных функций. Иными словами, в «кальциевом цикле» саркоплазматического ретикулума, как и в митохондриальном, отмечается известная диспропорция в изученности двух полуциклов, соответствующих путям входа и выхода $Ca^{2+}$.

В настоящем обзоре наряду с характеристикой механизмов транспорта ионов кальция через различные типы биологических мембран (преимущественно митохондриальные) специальное внимание уделено анализу использования их кальциевых насосов как своеобразных «каналов», по которым может происходить накопление и распределение в клетке ионов стронция. Несмотря на некоторые кинетические отличия в транспорте ионов кальция и стронция, осуществляемом различными типами кальциевых насосов, в целом он обеспечивается теми же механизмами (Carafoli et al., 1965; Carafoli, 1965a,b; Van der Kloot, Glovsky, 1965; Olson, Cazort., 1969; Mermier, Hasselbach, 1976). По-видимому, на определенных этапах эволюции (моллюски, ракообразные) транспорт стронция в митохондриях и эндоплазматическом ретикулуме может вовлекаться в физиологические механизмы, использующие у более высокоорганизованных форм животных в качестве составного элемента транспорт ионов кальция.

Интерес к аккумуляции ионов стронция объясняется и тем, что стронций, в отличие от кальция, не обладает повреждающим действием на митохондрии и, более того, стабилизирует структуру их мембран (Caplan, Carafoli, 1965; Greenawalt, Carafoli, 1966). В частности, именно при использовании стронция как аналога кальция со стабилизирующим эффектом появилась возможность моделировать длительные устойчивые колебания ионного состава и метаболизма в митохондриях (Холмухамедов, Гюльханданян, 1976; Gylkhandanyan et al., 1976), по-видимому, отражающие определенные физиологические состояния или механизмы регуляции.

«Стронцификация» тканей, очевидно, может детерминироваться как эволюционно, так и особенностями минерального состава пищи, используемой животными. В зависимости от этих, а

также от ряда других факторов аккумуляция ионов стронция в клетках животных тканей может рассматриваться в одних случаях как явление физиологическое, а в других — нежелательное, требующее специального внимания и контроля («Метаболизм стронция», 1971).

### ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И РАЗЛИЧНЫЕ КОНЦЕПЦИИ ТРАНСПОРТА ДВУХВАЛЕНТНЫХ КАТИОНОВ В МИТОХОНДРИЯХ ЖИВОТНЫХ ТКАНЕЙ

Наиболее общие свойства транслокации в митохондриях различных двухвалентных катионов ($Me^{2+}$) могут быть охарактеризованы следующим образом (Lehninger, 1966; 1970; 1972; Moore, 1972; Ташмухамедов, Гагельганс, 1973; Carafoli, 1974, 1975, 1979; Bygrave, 1977).

1. Транспорт $Me^{2+}$ зависит от энергии и обеспечивается окислением субстратов или гидролизом АТФ.

2. Транспорт $Me^{2+}$ ингибируется дыхательными ядами (при использовании энергии дыхания), олигомицином (при использовании АТФ как источника энергии), разобщителями (при АТФ-зависимом и зависимом от дыхания транспорте $Me^{2+}$).

3. Система транспорта $Me^{2+}$ избирательно блокируется низкими концентрациями лантанидов, рутениевого красного, гексаминокобальтохлорида и др.

4. Транспорт $Me^{2+}$ осуществляется электрофоретически при помощи специфического переносчика, локализованного во внутренней мембране митохондрий.

5. Накопление в митохондриях $Ca^{2+}$ или $Sr^{2+}$ сопровождается в зависимости от источника энергизации митохондрий стимуляцией дыхания (стехиометрия $Me^{2+}/0$) либо АТФазной активности (стехиометрия $Me^{2+}$/АТФ).

6. Движение $Me^{2+}$ через мембрану митохондрий, идущее с переносом двух положительных зарядов, сопровождается противоположно направленным движением (антипортом) ионов водорода (стехиометрия $H^+/Me^{2+}$) или калия. Стехиометрические коэффициенты $H^+/Ca^{2+}$ или $K^+/Ca^{2+}$ равны 2.

7. Транспорт $Me^{2+}$ ускоряется в присутствии проникающих анионов, таких как ацетат, фосфат, арсенат. Установлена стехиометрия однонаправленного движения (симпорта) $Me^{2+}$ и фосфата ($Me^{2+}/Ф_н$), равная 1,67 для $Ca^{2+}$ и 1,2—1,4 для $Sr^{2+}$.

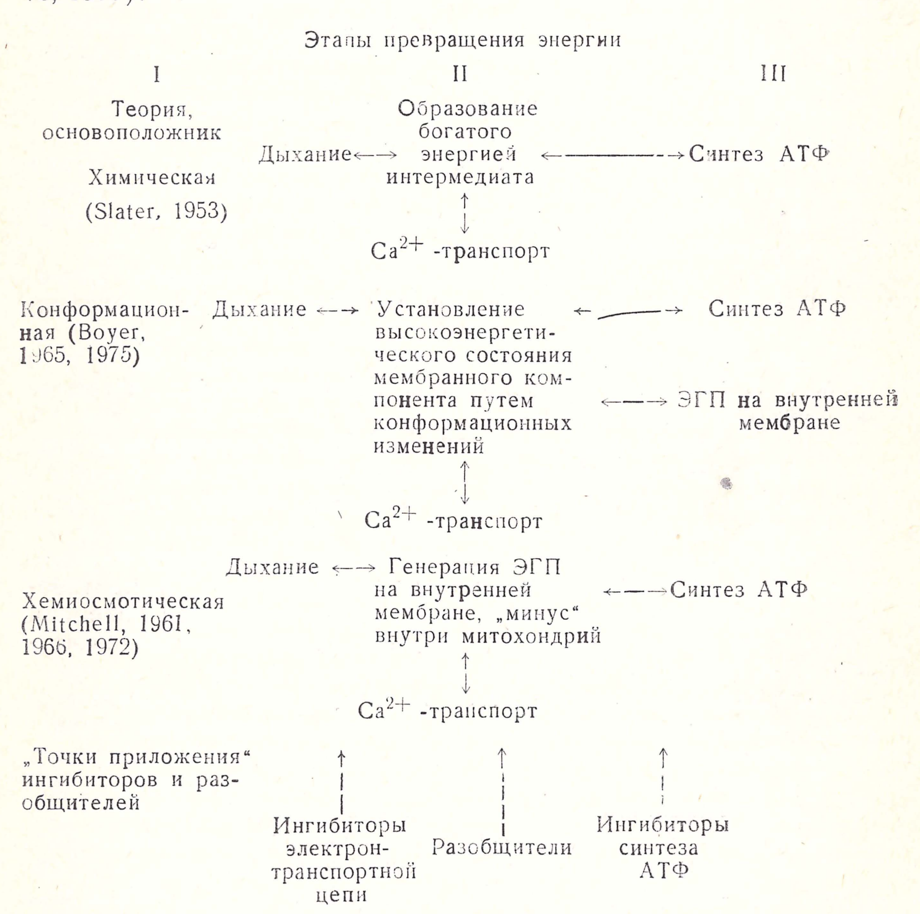
8. Концентрационная зависимость скорости транспорта $Me^{2+}$ характеризуется кинетикой насыщения (сигмоидные или гиперболические кривые в зависимости от источника выделения митохондрий, наличия магния в среде и других условий инкубации).

9. Транспорт $Me^{2+}$ с описанными выше признаками отсутствует у некоторых так называемых «кальций-негативных» митохондрий из дрожжей, мышц мухи.

В литературе существует несколько концепций, объясняющих активный транспорт двухвалентных катионов в соответствии с

решением основной идеи трансформации энергии в митохондриях. Принципиальное различие этих схем заключается в оценке природы движущих сил, обеспечивающих перемещение ионов через внутреннюю мембрану митохондрий (Скулачев, 1969, 1972; Lehninger, 1970; Liberman, Skulachev, 1970; Skulachev, 1971; Bygrave, 1977).

Приводим схему, показывающую движущие силы транспорта $Ca^{2+}$ в рамках ряда принципиальных теорий трансформации энергии в митохондриях. ЭГП — электрохимический градиент протонов, равный $\Delta pH + \Delta\psi$ (мембранный потенциал) (по Bygrave, 1977).




Согласно схеме, предложенной Chance (1965), аккумуляция ионов в митохондриях происходит в результате их стехиометрического взаимодействия с промежуточным высокоэнергетическим интермедиатом (X∼У), который образуется за счет работы ре-

докс-цепи или гидролиза АТФ. Такое взаимодействие вызывает расщепление гипотетического интермедиата на исходные компоненты (X+У) с пассивным высвобождением $H^+$ во внешнюю среду и перенос $Ca^{2+}$ внутрь митохондрий. Ингибирующее действие разобщителей на аккумуляцию ионов объясняется гидролизом этого интермедиата с рассеянием его энергии.

В схеме Chappell, Crofts (1966) предполагается существование в мембране митохондрий водородной помпы, функционирующей за счет редокс-превращений в дыхательной цепи или гидролиза АТФ. При этом двухвалентные катионы распределяются по электрическому полю и аккумулируются внутрь митохондрий. Действие разобщителей увеличивает проницаемость мембран для ионов $H^+$ и соответственно предотвращает аккумуляцию ионов в митохондриях.

Если в схеме Chappell, Crofts энергия окисления и АТФ сначала унифицируется в форме одного и того же высокоэнергетического интермедиата и лишь затем, с помощью специальной «протонной помпы», превращается в мембранный потенциал, то, согласно хемиосмотической концепции Mitchell (1961, 1966), перенос электронов непосредственно генерирует электрохимический потенциал $H^+$, состоящий из электрического ($\Delta\psi$) и химического ($\Delta pH$) компонентов. Иными словами, у Mitchell перемещение $H^+$ служит причиной, а у Chappel, Crofts — следствием накопления энергии в X ~ У. Как отмечает В. П. Скулачев (1972), в рамках концепции Mitchell вопрос о движущих силах транспорта $Ca^{2+}$ в митохондриях решается автоматически: $Ca^{2+}$ накапливается с помощью переносчика в результате электрофореза этого иона, т. е. движения по электрическому градиенту (знак «минус» внутри митохондрий, «плюс»— снаружи).

В соответствии с теорией Mitchell, катионы находятся в электрическом равновесии, а связь между метаболизмом и транспортом ионов осуществляется через мембранный потенциал. Генерация последнего может осуществляться любым способом: за счет метаболизма или путем индукции оттока $K^+$ из митохондрий, однако во всех случаях удается наглядно продемонстрировать электрофорез ионов кальция (Scarpa, Azzone, 1970).

Критический анализ различных концепций и теорий трансформации энергии приводится в работах В. П. Скулачева (1969, 1972). По-видимому, только хемиосмотическая теория Mitchell оказалась наиболее «жизнеспособной» и корректной.

Концепция переносчика для транслокации двухвалентных катионов в митохондриях была выдвинута в различных лабораториях на основании анализа ингибиторного эффекта лантанидов на аэробное поглощение катионов, а также на их транслокацию в деэнергизованных митохондриях (Lehninger, 1970; Selwyn et al., 1970). Наличие лантанидчувствительного транспорта двухвалентных катионов в деэнергизованных митохондриях (Selwyn at al., 1970), т. е. в условиях, препятствующих синтезу высокоэнергети-

ческого интермедиата, противоречит постулированному в рамках «химических» концепций (Chance, 1965) участию X ~ У в переносе $Me^{2+}$ через мембрану.

### КИНЕТИКА И СТЕХИОМЕТРИЯ ЗАВИСЯЩЕЙ ОТ ДЫХАНИЯ АККУМУЛЯЦИИ $Sr^{2+}$ В МИТОХОНДРИЯХ

Многочисленные данные позволяют считать, что транспорт различных двухвалентных катионов в митохондриях обеспечивается идентичным механизмом, который в зависимости от ряда специфических параметров транспортируемого катиона (радиус иона, плотность заряда и т. д.) допускает широкую вариацию функциональных ответов митохондрий в процессе транслокации. В целом избирательность митохондриальной системы транспорта для отдельных двухвалентных катионов может быть представлена следующим образом: $Ca^{2+} \geqslant Sr^{2+} > Mn^{2+} \geqslant Ba^{2+}$ (Carafoli, 1965 b; Drahota et al., 1969).

Сродство митохондрий к различным катионам можно оценить по эффекту 0,2 мM $Me^{2+}$ на скорость потребления кислорода (Carafoli, 1965 b), при этом оказывается, что $Ca^{2+}$ стимулирует дыхание на сукцинате в 7,3 раза, $Sr^{2+}$ — в 5,6, $Mn^{2+}$ и $Ba^{2+}$ — в 1,3 раза, $Be^{2+}$ не оказывает какого-либо эффекта. При окислении митохондриями β-гидроксибутирата или смеси глутамат+малат $Sr^{2+}$, как и $Ca^{2+}$, вызывает 10-кратную стимуляцию дыхания, в то время как $Mn^{2+}$ или $Ba^{2+}$ — примерно двукратную. Аналогичная избирательность наблюдается при моделировании системы транспорта двухвалентных катионов на бислойных мембранах, сформированных из митохондриальных фосфолипидов (Кудзина и др., 1977), которые, по-видимому, содержали в своем составе переносчик двухвалентных катионов. О наличии общего механизма для транспорта различных щелочноземельных катионов свидетельствует также конкурентное торможение стронцием транспорта кальция (Carafoli, 1965a) и специфическое ингибирование энергозависимой или пассивной транслокации двухвалентных катионов лантанидами, рутениевым красным или гексаминокобальтохлоридом (Mela, 1968; Moore, 1971, 1972; Tashmukhamedov et al., 1972). Все это позволяет использовать применительно к стронциевому транспорту часть информации общего характера, полученной с использованием кальция, как наиболее изученного и «физиологичного» аналога в отношении действия на митохондрии.

В серии работ, опубликованной Carafoli et al. (Carafoli et al., 1965; Carafoli, 1965a, b; Caplan, Carafoli, 1965; Greenawalt, Carafoli, 1966), была впервые достаточно полно описана энергозависимая аккумуляция $Sr^{2+}$ в митохондриях печени крыс. Некоторые стехиометрические, кинетические и функциональные характеристики транспорта $Ca^{2+}$ и $Sr^{2+}$, представленные в этих, а также некоторых других работах (Ташмухамедов, Гагельганс, 1973; Gear et al., 1967), приведены ниже (условия аэробные, среда содержит фосфат и сукцинат).

| *Параметр транспорта $Me^{2+}$* | $Ca^{2+}$ | $Sr^{2+}$ |
|---|---|---|
| Скорость транспорта, нг—ион/мин·мг белка | 1000 | 500 |
| $K_m$ аккумуляции, мМ | 0,04 | 0,1* |
| Максимальная аккумулирующая емкость, нг—ион $Me^{2+}$ /мг белка | 650—1900 | 2500 |
| Стимуляция дыхания в присутствии 0,2 мМ $Me^{2+}$ | 7 | 5—6 раз |
| $H^+/Me^{2+}$ ** | 2,0 | |
| $Me^{2+}$ /0 | 2,65—4,4 | 3,8 |
| Стехиометрия $Me^{2+}$ / участок сопряжения | 1,7—2,0 | 1,8—2,0 |
| $Me^{2+}$ /$Ф_н$ | 1,67 | 1,2—1,4 |
| $K_i$ ионами лантана в среде без фосфата | $5 \cdot 10^{-8}$ М | $1 \times 10^{-7}$ М |
| Состояние $Me^{2+}$ в матриксе митохондрий (пассивная аккумуляция) | Гидроксиапатит | Гидроксиапатит и фосфат стронция |
| Состояние окислительного фосфорилирования в митохондриях, нагруженных $Me^+$ | Разобщенное | Сопряженное |

* Субстрат окисления β-оксибутират.
** Среда без фосфата.

Как видно из приведенных данных, митохондрии аккумулируют около двух ионов $Me^{2+}$ при переносе пары электронов через один участок сопряжения; стехиометрия антипорта $H^+$ и $Me^{2+}$ равна 2 в условиях, исключающих движение фосфата через внутреннюю мембрану митохондрий. Величина максимальной аккумулирующей емкости соответствует условиям «массивного» накопления $Me^{2+}$, т. е. среда содержит наряду с субстратом окисления фосфат, $Mg^{2+}$ и АТФ. Условия инкубации в значительной мере влияют на аккумулирующую «емкость» митохондрий, в частности, исключение $Mg^{2+}$ из инкубационной среды уменьшает аккумуляцию $Sr^{2+}$ примерно в 2,5 раза, а в отсутствие фосфата она снижается более чем в 5 раз (Carafoli et al., 1965). В бесфосфатной среде процесс аккумуляции, по-видимому, лимитируется числом мембранных анионных групп, участвующих в фиксации $Ca^{2+}$ и $Sr^{2+}$ во внутреннем компартменте митохондрий. Не исключено, однако, что даже в среде, не содержащей добавленного извне фосфата, в движении $Me^{2+}$ через митохондриальную мембрану участвует эндогенный фосфат.

Согласно данным Moyle, Mitchell (1977), симпорт двух ионов фосфата — обязательное условие транслокации 1 иона кальция или стронция. Такое «жесткое» сопряжение транспорта $Me^{2+}$ и фосфата, по мнению авторов, обусловлено наличием в митохондриях ингибируемого лантаном кальций-фосфатного портера, бо-

лее точно описываемого как «$(Ca)^{2+}$—$HPO_4^{-2}$-симпортер». Стехиометрия $Sr^{2+}$/$Ф_н$, по наблюдениям этих авторов, равна 2,04—2,10, т. е. несколько отлична от данных, представленных выше. Это, возможно, объясняется либо тем, что весь добавленный $Sr^{2+}$ аккумулируется, либо условиями эксперимента. Можно полагать, что отношение $Sr^{2+}$/$Ф_н$ или $Ca^{2+}$/$Ф_н$ отражает только химический состав фосфатных соединений, в виде которых $Sr^{+}$ или $Ca^{2+}$ секвестрируются в матриксе митохондрий, но не работу более чем гипотетичного «$Me^{2+}$-фосфатного портера» во внутренней мембране. В исследованиях других авторов (Reynafarje, Lehninger, 1977; Akerman, 1978; Carafoli, 1979; Deana et al., 1979) четко показано, что $Ca^{2+}$ транспортируется через мембрану митохондрий даже при блокировании переносчика фосфата N-этилмалеимидом; при этом стехиометрия переносимого электрического заряда составила не 1 «плюс» на 1 транспортированный $Ca^{2+}$, как предполагали Moyle, Mitchell (1977), а 2 «плюса» на 1 $Ca^{2+}$. Предположение о существовании «кальций-фосфатного симпортера» возникло в результате так называемых «термодинамических затруднений» теории Mitchell, которые выводились на основании ряда коэффициентов стехиометрии или ложных посылок о характере распределения $Ca^{2+}$ на внутренней мембране митохондрий, не учитывающих равновесной природы этого процесса. При этом традиционная последовательность выкладок выглядела следующим образом. Если полагать, что на мембране энергизованных митохондрий имеется разность потенциалов («минус» внутри) величиной 180 мВ (Mitchell, 1966) и что электрофоретический переносчик $Ca^{2+}$ перемещает 2 заряда во время одного «оборота», то можно на основании уравнения Нернста ожидать, что градиент активностей $Ca^{2+}$ на внутренней мембране должен быть равен $1 \cdot 10^6$, что нереально. Косвенные измерения этого градиента, в силу невозможности прямых, дают существенно меньшие величины — от 0 до $1 \cdot 10^3$ (Carafoli, 1979).

Если бы предположение Moyle, Mitchell (1977) о «жестком» симпорте $Ca^{2+}$ и фосфата оказалось корректным (чего, однако, не произошло), то нернстовское равновесие достигалось бы на мембране энергизованных митохондрий при градиенте активностей $Ca^{2+}$, равном $1 \cdot 10^3$. Тем не менее, реально наблюдаемые градиенты $Ca^{2+}$ на внутренней мембране митохондрий, никак не вступая в конфликт с теорией Mitchell, могут быть объяснены наличием в матриксе митохондрий равновесного уровня $Ca^{2+}$, который обеспечивается электрофоретическим входом (унипортом) $Ca^{2+}$, зависящим от мембранного потенциала, и выходом $Ca^{2+}$ из митохондрий через систему электронейтрального обмена (антипорт) $H^{+}/Ca^{2+}$ или $Na^{+}/Ca^{2+}$, не зависящего от мембранного потенциала. В результате такого «кальциевого цикла» (Carafoli, 1979) в ответ на мембранный потенциал величиной 180 мВ в митохондриях могут накапливаться различные количества $Ca^{2+}$ и

на их мембране могут поддерживаться любые градиенты активности $Ca^{2+}$ ($0—10^3$ или выше) в зависимости от интенсивности потоков $Ca^{2+}$ внутрь и наружу митохондрий.

Продолжая изложение данных о сопутствующем транспорту $Me^{2+}$ переносе фосфата, следует отметить, что образование в матриксе митохондрий электронноплотных гранул фосфата стронция было отмечено в условиях in vitro при инкубации изолированных митохондрий печени с возрастающими концентрациями $Sr^{2+}$ (Greenawalt, Carafoli, 1966) и in situ при экспозиции гладких мышц в $Sr^{2+}$-содержащих растворах (Somlyo, Somlyo, 1971; Somlyo, Somlyo, 1974). Количество электронноплотных гранул фосфата стронция размером до 70 нм в матриксе митохондрий достигает 200—400, в последующем они сливаются в длинные тяжи (Greenawalt, Carafoli, 1966). Накопление в матриксе митохондрий двухвалентных катионов в виде фосфатов, по-видимому, является достаточно физиологичным процессом и определяется функциональными особенностями ткани (Lehninger, 1970; Carafoli, 1974).

Аккумуляция $Ca^{2+}$ и $Sr^{2+}$ сопровождается стимуляцией дыхания, которая обычно прекращается с завершением переноса катиона через внутреннюю мембрану. Циклический характер функциональных ответов митохондрий на добавление $Ca^{2+}$ или $Sr^{2+}$ имеет и ряд других параметров: редокс-состояние дыхательных переносчиков, объем митохондрий, распределение $H^+$, $K^+$ и других ионов на внутренней мембране и т. д. Такие циклические ответы наблюдаются в пределах аккумулирующей «емкости» митохондрий для соответствующего вида катиона.

При исследовании кинетики активного транспорта $Ca^{2+}$ и $Sr^{2+}$ мы использовали одновременную регистрацию: скорости потребления кислорода, сдвигов pH среды, обусловленных движением $H^+$ через внутреннюю мембрану митохондрий, уровня восстановленности НАД(Ф) и светорассеяния суспензии, характеризующего изменения объема митохондрий вследствие переноса ионов как осмотически активных веществ (рис. 1).

Ионы кальция и стронция в использованных количествах вызывают стимуляцию дыхания митохондрий соответственно в 7,2 и 3,1 раза. Стимуляция потребления кислорода коррелирует со скоростью аккумуляции данных ионов, которая может быть рассчитана по длительности каждого цикла изменений функциональных параметров.

После накопления критических количеств $Ca^{2+}$ (80—100 нг—ион $Ca^{2+}$/мг белка) происходит высокоамплитудное набухание митохондрий (рис. 1), в частности, уже вторая добавка $Ca^{2+}$ вызывает 11-кратное ускорение набухания; необратимое окисление НАД(Ф)·Н, нециклическое, длительное увеличение скорости дыхания и характерный возврат pH суспензии к исходному значению, что кинетически соответствует потере митохондриями аккумулированного кальция. В этих условиях наблюдается полное

разобщение окислительного фосфорилирования. При накоплении меньших количеств $Ca^{2+}$ изменения функциональных параметров носят циклический, обратимый характер, митохондрии сохраняют способность к синтезу АТФ.

В отличие от $Ca^{2+}$, аккумуляция ионов стронция сопровождается стабилизацией структуры митохондрий (рис. 1). Возможно, что именно поэтому функциональные ответы митохондрий, вызываемые транспортом $Sr^{2+}$, имеют обратимый характер даже при использовании этого катиона в количествах, вдвое превышающих $Ca^{2+}$-аккумулирующую емкость.

Сопоставление эффекта различных двухвалентных катионов, способных аккумулироваться в митохондриях, показывает, что

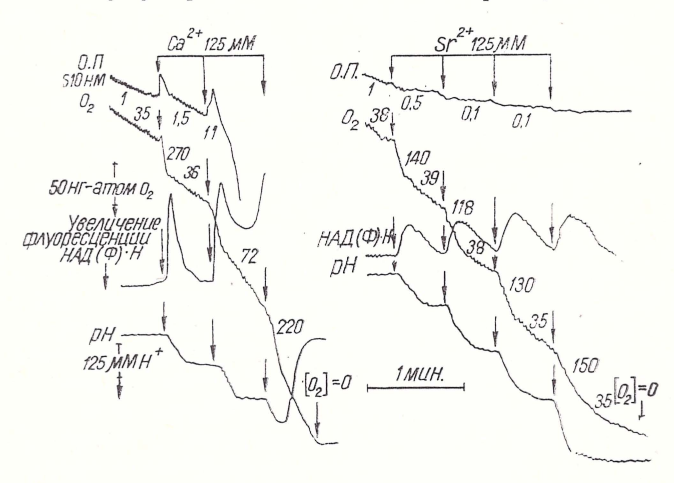



Рис. 1. Эффект последовательных добавок ионов кальция и стронция на некоторые функциональные параметры митохондрий печени крыс. У кривой О. П. указана относительная скорость набухания. Цифры у кривой $O_2$ означают скорость потребления кислорода митохондриями (нмоль $O_2$/мин). Инкубационная среда содержала 120 мМ KCl, 5 мМ трис-хлорида (pH 7,4), 5 мМ сукцината, 2,5 мМ $KH_2PO_4$; митохондриальный белок—2,4 мг/мл; объем ячейки 4 мл.

только $Ca^{2+}$ обладает повреждающим действием в относительно высоких концентрациях (рис. 2). При регистрации транспорта ионов по сдвигам pH установлено, что вслед за фазой накопления $Ca^{2+}$ в митохондриях (подкисление среды) следует его самопроизвольный выброс в среду (возврат pH к исходному значению), связанный с повреждением структуры митохондрий. Подобный выброс отсутствует при замене $Ca^{2+}$ на $Sr^{2+}$, $Mn^{2+}$ или $Ba^{2+}$ и может быть инициирован добавлением разобщителя 2,4-динитрофенола (рис. 2). Стабилизирующее действие ионов стронция на митохондрии проявляется и в его способности предотвращать $Ca^{2+}$, тироксин- или олеатиндуцированное набухание, а также

обращать это набухание, если оно произошло (Caplan, Carafoli, 1965).

По предположению Caplan, Carafoli (1965), в основе такого стабилизирующего эффекта ионов стронция лежит формирование с их помощью «мостиков» между отрицательно заряженными участками, представленными остатками сиаловых кислот. Эти мостики, повышая жесткость митохондриального каркаса, препятствуют увеличению объема органелл в присутствии некоторых индукторов набухания.

С другой стороны, повреждающий эффект $Ca^{2+}$ и стабилизирующий $Sr^{2+}$, возможно, обусловлен неодинаковым действием этих катионов на митохондриальную фосфолипазу. Известно, что многочисленные типы повреждения митохондрий (аноксия, ста-

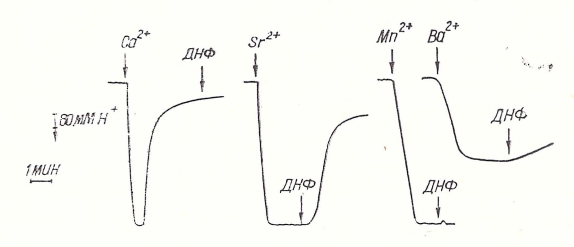



Рис. 2. Кинетика движения $H^+$ во время транслокации 0,68 мМ различных двухвалентных катионов через мембрану митохондрий. Среда инкубации во всех случаях содержала 120 мМ KCl, 3 мМ сукцината, 2,5 мМ $KH_2PO_4$ (pH-7,4); конечная концентрация ДНФ составляла $5 \times 10^{-4}$ М.

рение органелл, олеат- или $Ca^{2+}$-индуцированное набухание) связаны в конечном счете с активацией фосфолипазы $A_2$, локализованной в наружном «отсеке» митохондрий и активируемой ионами кальция или жирными кислотами (Сороковой, Владимиров, 1975). Локальные анестетики ингибируют митохондриальную фосфолипазу, конкурируя с $Ca^{2+}$ (Scarpa, Lindsay, 1972; Sherphof, 1973), и вместе с тем оказывают выраженный стабилизирующий эффект на суспензию органелл. Механизм повреждающего действия $Ca^{2+}$ на структуру и функции митохондрий проявляется, видимо, в тех случаях, когда происходит насыщение внутримитохондриальных кальциевых «депо» (рис. 1) и концентрация этого катиона в наружном компартменте возрастает. При этом ионы кальция активируют фосфолипазу $A_2$, а дальнейшая стимуляция этого фермента обеспечивается $Ca^{2+}$, поступающим из внутримитохондриальных участков связывания, и жирными кислотами, высвобождаемыми при гидролизе фосфолипидов (Scarpa, Lindsay, 1972), т. е. реакция в целом имеет характер автокаталитического процесса. Расщепление фосфолипидов, а также появление лизофосфолипидов с детергентными свойствами приводят к уменьшению «жесткости» митохондриального каркаса, увеличению проницаемости мембран и их лизису. Для восстановления функционального сос-

тояния митохондрий после $Ca^{2+}$-индуцированного набухания обычно требуется сложный набор компонентов: ЭГТА, $Mg^{2+}$, бычий сывороточный альбумин (Crofts, Chappel, 1965). Предполагается, что некоторые нарушения, относящиеся к мембранной патологии, включают описанный выше механизм (Сороковой, Владимиров, 1975).

Ионы стронция, по-видимому, являются достаточно удобным инструментом для выяснения вклада митохондриальной фосфолипазы в развитие патологий как на субклеточном, так и на более сложно организованном уровнях. С одной стороны, $Sr^{2+}$ может рассматриваться как аналог $Ca^{2+}$ в отношении транспорта в митохондриях, с другой стороны, этот катион, очевидно, является конкурентным по $Ca^{2+}$ ингибитором митохондриальной фосфолипазы. Такой вывод возможен на основе аналогии с панкреатической фосфолипазой (Pieterson et al., 1974) и фосфолипазами змеиных ядов (Strong et al., 1976), где $Sr^{2+}$ оказывает ингибирующий эффект, конкурируя с $Ca^{2+}$ за участки его связывания. Выяснение эффекта $Sr^{2+}$ на митохондриальную фосфолипазу $A_2$, несомненно, требует специальных исследований.

## КИНЕТИКА И МЕХАНИЗМ КОЛЕБАТЕЛЬНЫХ СОСТОЯНИЙ, ИНДУЦИРУЕМЫХ $Sr^{2+}$ В МИТОХОНДРИЯХ ПЕЧЕНИ

Одна из интересных особенностей транспорта $Sr^{2+}$ в митохондриях — возможность демонстрации его колебательной кинетики (Ташмухамедов, Гагельганс, 1970; Gylkhandanyan at al., 1976; Холмухамедов, Гюльханданян, 1976; Холмухамедов, 1979). Ранее в лаборатории Ленинджера было продемонстрировано наличие одиночных «всплесков» в кинетике аккумуляции $Ca^{2+}$ и $Sr^{2+}$, но не $Mn^{2+}$ (Carafoli et al., 1966), и подробно рассмотрены условия их возникновения при поглощении $Ca^{2+}$. Характерно, что «всплески» наблюдаются в гипоосмотической солевой среде, не содержащей проникающих анионов, таких как ацетат, фосфат. По мнению других авторов (Chance, Yoshioka, 1966), демонстрация одиночного «всплеска» не является убедительным аргументом для причисления указанного процесса к колебательным, поскольку одиночный колебательный цикл не позволяет рассчитать ни фактор затухания (соотношение амплитуд двух последовательных циклов), ни другие специфические параметры осцилляций.

Накопление одновалентных ионов, в отличие от двухвалентных катионов, сопровождается устойчивым колебательным состоянием в кислой среде pH 6,0—6,5 (Chance, Yoshioka, 1966) или сильно затухающими колебаниями при нейтральных значениях pH (Packer et al., 1966; Utsumi, Packer, 1967). Характер осцилляций принимает не только кинетика транспорта $K^+$ или $Na^+$, но и уровень восстановленности НАД, структурные изменения и т. д. Указанные колебания происходят лишь в присутствии проникающих анионов в инкубационной среде и тормозятся двухвалентными катионами.

Механизмы транслокации одно- и двухвалетных катионов обладают некоторыми общими закономерностями, включающими зависимость от мембранного потенциала и системы обратной связи. Можно предположить по аналогии с одновалентными катионами, что обнаруженный в лаборатории Ленинджера (Carafoli et al., 1966) феномен «всплеска» в кинетике аккумуляции кальция и стронция является, вероятно, первым циклом затухающего колебательного процесса, обнаружение которого представляет несомненный интерес для понимания принципов регуляции активного транспорта в митохондриях и их функционального состояния в целом.

С целью дальнейшего выяснения факторов, влияющих на амплитуду и период «всплеска», мы (Ташмухамедов, Гагельганс, 1970) исследовали кинетику транслокации ионов стронция. Использование этого катиона более предпочтительно по сравнению с $Ca^{2+}$, который, как было отмечено, оказывает повреждающее действие на структуру митохондрий и связанные с ней функции. Рис. 3 иллюстрирует возникновение «всплеска» в кинетике транслокации $Sr^{2+}$ в митохондриях, инкубированных в бесфосфатной среде. Уменьшение концентрации KCl в среде до 30—40 мМ приводит к затухающему колебательному процессу в кинетике аккумуляции $Sr^{2+}$, регистрируемой по изменению pH суспензии. Указанная концентрация KCl является оптимальной, так как любое ее увеличение или уменьшение препятствует проявлению колебаний. Несмотря на отчетливую зависимость осцилляций, индуцированных $Sr^{2+}$, от содержания $K^+$ в среде, по-видимому, именно перемещение $Sr^{2+}$, а не $K^+$ является звеном, ответственным за колебания, так как колебательные процессы, обусловленные движением одновалентных катионов через мембрану митохондрий, ингибируются в присутствии двухвалентных катионов. Рассмотренные выше данные позволяют считать, что «всплески» в кинетике аккумуляции двухвалентных катионов, впервые описанные Ленинджером с сотр., по-видимому, представляют собой начальную фазу затухающего колебательного процесса. Для демонстрации этого процесса необходим учет таких факторов, как начальная амплитуда, период «всплеска», оптимальное соотношение количества митохондрий и концентрации отдельных компонентов реакционной смеси и т. д.

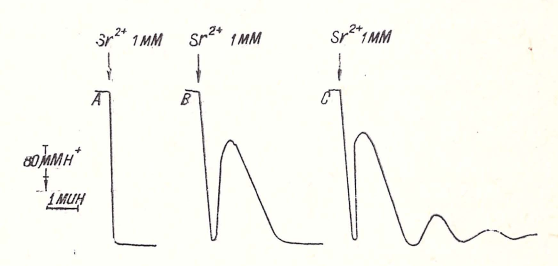



Рис. 3. Влияние условий инкубации на проявление колебательной кинетики транспорта стронция в митохондриях печени крыс.

*A*—среда инкубации та же, что указана к рис. 2; *B*—из среды исключен фосфат; *C*—из среды исключен фосфат, концентрация KCl уменьшена до 30 мМ.

Возможная схема генерации колебательных состояний предложена Utsumi, Packer (1967) для системы с одновалентными катионами. Индукция колебательной кинетики аккумуляции катионов, по мнению авторов, обеспечивается за счет обратной связи между состоянием проницаемости мембран митохондрий, с одной стороны, и изменением их способности аккумулировать катионы— с другой. При этом высокой проницаемости мембраны соответствует отток ионов наружу, после чего митохондрии сокращаются, восстанавливая исходную низкую проницаемость и способность аккумулировать ионы.

В лаборатории Евдотиенко (Евдотиенко, 1979; Gylkhandanyan et al., 1976; Холмухамедов, 1979) были подобраны условия (специфические концентрации $Sr^{2+}$ или $Ca^{2+}$, валиномицина, ротенона, $K^{+}$ и $H^{+}$), при которых $Sr^{2+}$ индуцировал хорошо выраженные, устойчивые в течение нескольких часов осцилляции с периодом 2—15 мин в зависимости от состава среды. Колебательный режим приобретали потоки $K^{+}$, $H^{+}$, $Sr^{2+}$ или $Ca^{2+}$, компенсирующим анионом при этом является, видимо, сукцинат (Холмухамедов, 1979). В одной из схем авторы предполагают участие митохондриальной фосфолипазы, а также систем ресинтеза фосфолипидов и жирных кислот в регуляции циклических изменений проницаемости внутренних мембран митохондрий (Гюльханданян, 1977). В другой схеме (Холмухамедов, 1979) наиболее существенная роль в регуляции автоколебаний отводится вариациям активности митохондриальной системы электронейтрального обмена $H^{+}/Me^{2+}$ и компенсации суммарного потока положительных зарядов потоком сукцината, также имеющим колебательный характер.

Как уже было отмечено, стронций, в отличие от кальция, вызывает в митохондриях в основном обратимые изменения, поэтому использование $Sr^{2+}$ как аналога $Ca^{2+}$ создает предпосылку для выявления важного механизма регуляции транспорта ионов и других зависящих от мембранного потенциала функций митохондрий, которые в физиологических условиях могут контролироваться кальцием.

## ОСОБЕННОСТИ АТФ-ЗАВИСИМОГО ТРАНСПОРТА В МИТОХОНДРИЯХ

Ионы стронция, аналогично ионам кальция, транспортируются примерно с одинаковой начальной скоростью как при функционировании дыхательной цепи, так и за счет гидролиза АТФ (Carafoli et al., 1965; Vasington, 1966). В условиях накопления митохондриями эквивалентных количеств $Ca^{2+}$ или $Sr^{2+}$ расход АТФ в случае $Sr^{2+}$ намного ниже (Caplan, Carafoli, 1965). Причины этого были изучены нами в специальной серии экспериментов (Ташмухамедов, Гагельганс, 1973).

При исследовании АТФазной активности митохондрий мы определили (рис. 4), что с повышением концентрации $Ca^{2+}$ проис-

ходит скачкообразное увеличение скорости гидролиза АТФ с полумаксимумом при 90 нг-ион $Ca^{2+}$/мг белка. $Sr^{2+}$ и $Mn^{2+}$, в отличие от $Ca^{2+}$, не индуцируют подобного «скачка» АТФазной активности. На митохондриях, состаренных при 37°C в течение 45 мин и не обладающих ион-транспортирующей функцией, $Ca^{2+}$ и $Sr^{2+}$ не стимулируют АТФазную активность, однако $Mn^{2+}$ увеличивает ее в 4—5 раз, действуя как аналог $Mg^{2+}$. $Ca^{2+}$-индуцированный гидролиз АТФ отражает энергетические затраты на активный транспорт $Ca^{2+}$ внутрь митохондрий, однако при определенной степени «насыщения» митохондрий кальцием наступает их набухание и (или) активация системы обмена $H^+/Ca^{2+}$, вследствие чего возрастает утечка $Ca^{2+}$ наружу. В свою очередь, уве-

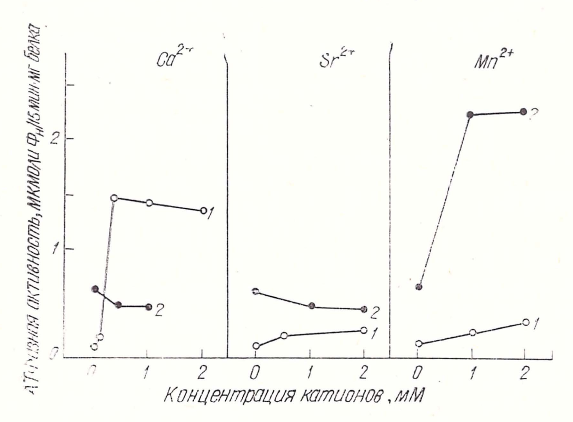



Рис. 4. Эффект двухвалентных катионов на АТФазную активность интактных (*1*) и состаренных (*2*) митохондрий. Среда инкубации содержала 100 мМ сахарозы, 75 мМ KCl, 15 мМ трис-хлорида (pH 7,7), 7,5 мМ АТФ; температура 30°C, время инкубации 15 мин, объем пробы 2 мл. Реакцию останавливали добавлением трихлоруксусной кислоты до конечной концентрации 3,5%.

личение внемитохондриальной концентрации кальция является причиной стимуляции АТФ-зависимого транспорта $Ca^{2+}$, т. е. происходит своеобразная рециклизация потоков данного катиона между внутри- и внемитохондриальным пространством («кальциевый цикл»), которая вызывает истощение энергетических источников при низкой концентрации $Ca^{2+}$ внутри митохондрий. Такая ситуация, возможно, приводит к рассмотренному выше активированию кальцием митохондриальной фосфолипазы, локализованной во внешнем отсеке. Продукты гидролиза фосфолипидов являются эффективными агентами, нарушающими структуру митохондрий и увеличивающими проницаемость внутренних мембран. В результате такого шунта на мембране наблюдается резкое увеличение АТФазной активности.

Ионы стронция активно тормозят описанную выше $Ca^{2+}$-индуцированную АТФазную активность митохондрий (рис. 5), что согласуется с наблюдениями других авторов (Caplan, Carafoli,

1965). Эффективными ингибиторами являются и ионы лантана. В основе этого явления, видимо, лежит, с одной стороны, конкуренция $Ca^{2+}$ и $Sr^{2+}$ или $La^{3+}$ за общую систему транспорта и, с другой стороны,— ингибирующее действие $Sr^{2+}$ на митохондриальную фосфолипазу. В результате стабилизации стронцием внутренней мембраны (прямо или косвенно — через торможение фосфолипазы), очевидно, происходит снижение обмена $Ca^{2+}$ между внутренним и наружным «отсеками» митохондрий и соответственно снижается гидролиз АТФ.

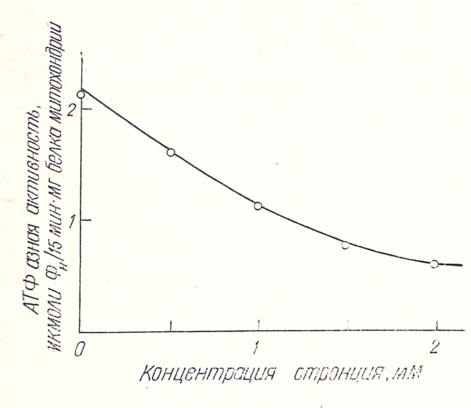



Рис. 5. Ингибирующий эффект стронция на $Ca^{2+}$-индуцированную АТФазную активность митохондрий печени крыс. АТФазная активность стимулирована 1 мМ $CaCl_2$. Условия инкубации те же, что указаны к рис. 4.

При АТФ-зависимом транспорте $Sr^{2+}$, как показали Carafoli et al. (1965), наблюдаются быстрая и медленная фазы аккумуляции, причем первая не ингибируется олигомицином. Эти данные не позволяют рассматривать АТФ-зависимый быстрый перенос $Sr^{2+}$ через мембрану митохондрий как следствие простого обращения механизма трансформации энергии. На это же указывают и результаты исследований Vasington (1966), изучавшего аккумуляцию $Ca^{2+}$ и $Sr^{2+}$ в интактных и отмытых водой митохондриях. В препарате отмытых органелл сохранялась сукцинатзависимая аккумуляция $Sr^{2+}$ и $Ca^{2+}$, а также АТФ-зависимое накопление $Ca^{2+}$, однако существенно повреждалась АТФ-зависимая аккумуляция $Sr^{2+}$.

## ИНГИБИТОРЫ ТРАНСПОРТА $Me^{2+}$ В МИТОХОНДРИЯХ

Важная информация о системе транспорта двухвалентных катионов в митохондриях получена с помощью ингибиторного анализа. В экспериментах Mela (1968) продемонстрирована способность низких концентраций лантанидов ($10^{-7}$ М/л) специфически ингибировать транслокацию ионов $Ca^{2+}$ и $Mn^{2+}$. Аналогичным образом тормозится и транспорт стронция (рис. 6), причем ингибирование лантаном переноса двухвалентных катионов идет по конкурентному механизму (Ташмухамедов, Гагельганс, 1973; Lehninger, Carafoli, 1971) с $K_i = 5 \cdot 10^{-8}$ М. Вместе с тем, лантаниды даже в относительно высоких концентрациях (около $1 \cdot 10^{-4}$ М) практически не влияют на другие энергозависимые процессы в митохондриях. $La^{3+}$ оказывает только тормозящее действие на транспорт ионов кальция или стронция, однако при исследовании

аккумуляции $Mn^{2+}$ небольшие концентрации лантана ($5 \cdot 10^{-8}$ М) вызывают трехкратную стимуляцию скорости аккумуляции, а ингибирующий эффект достигается при концентрациях $La^{3+}$ выше $2 \cdot 10^{-7}$ М (рис. 6). Аналогично лантанидам, стимуляцию транспорта $Mn^{2+}$ вызывают $K^{+}$, $Mg^{2+}$, $Ca^{2+}$, гексаминокобальтохлорид и некоторые другие соединения (Mela, 1968; Vainio et al., 1970; Ташмухамедов, Гагельганс, 1973). Причиной этого, по-видимому, является «бивалентность» переносчика двухвалентных катионов (Vinogradov, Scarpa, 1973; Reed, Bygrave, 1975; Heaton, Nicholls, 1976), причем один участок связывания является «регуляторным» и после взаимодействия с лигандом ($Ca^{2+}$, $La^{3+}$, ГАК и др.) обес-

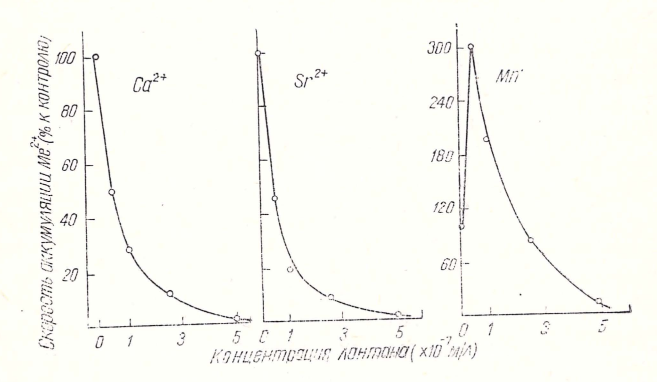



Рис. 6. Эффект различных концентраций лантана на скорость аккумуляции ионов кальция, стронция и марганца в митохондриях печени крыс. Среда инкубации та же, что указана к рис. 2, но не содержит фосфата.

печивает, по-видимому, эффективную фиксацию иона марганца во втором участке связывания с последующим транспортом через мембрану митохондрий. Наличие двух участков связывания в митохондриальном переносчике двухвалентных катионов находит свое отражение в сигмоидной зависимости скорости транспорта от концентрации $Ca^{2+}$.

Ингибирующий эффект $La^{3+}$ на транспорт $Ca^{2+}$ в митохондриях и других структурах, вероятно, обусловлен тем, что $La^{3+}$ имеет примерно одинаковый с $Ca^{2+}$ радиус гидратированного иона (0,31 и 0,28 нм соответственно), но значительно более высокую плотноть заряда и, следовательно, большее сродство к отрицательно заряженным $Ca^{2+}$-связывающим участкам биомембран (Lettwin et al., 1964). Эти участки могут иметь фосфолипидную, белковую или гликопротеидную природу.

Взаимодействие ионов лантана с кальциевым переносчиком митохондрий сопровождается их медленной аккумуляцией внутри митохондрий, в результате ингибирующий эффект со временем убывает (Bygrave, 1977).

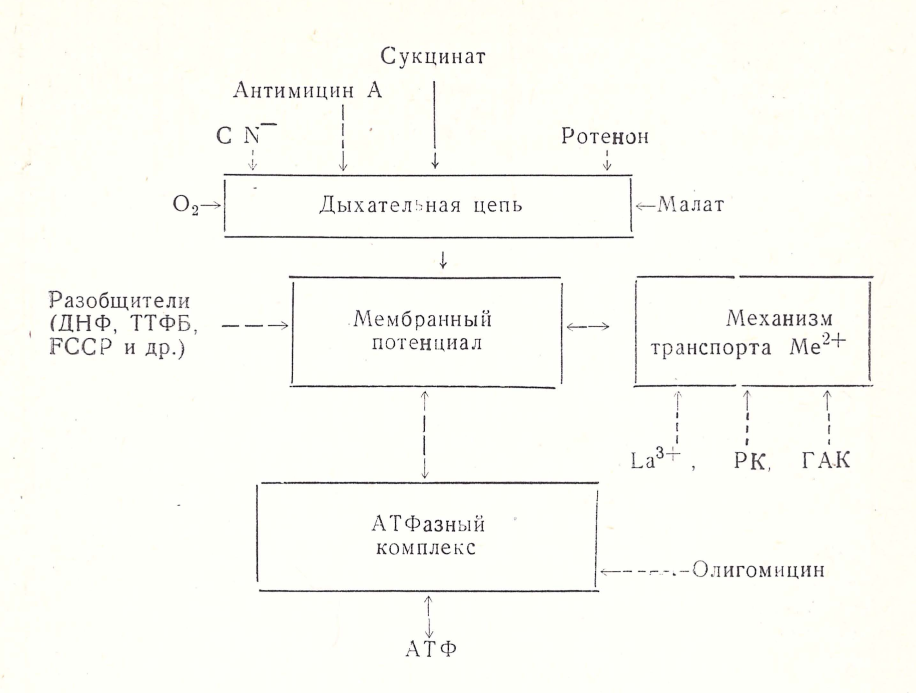
Показано, что комплексное соединение рутения — рутениевый красный, широко используемый в цитохимических исследованиях для идентификации мукополисахаридов, в концентрации 4—6 н молей/мг белка эффективно подавляет транспорт $Ca^{2+}$ и обусловленную им стимуляцию дыхания, не влияя на фосфорилирование (Moore, 1971, 1972). В отличие от лантана, рутениевый красный не взаимодействует с фосфатом и не аккумулируется в митохондриях (Bygrave, 1977), что является преимуществом при использовании его в биологических экспериментах. Исследования других авторов выявили тормозящее действие этого красителя на митохондриальный транспорт $Sr^{2+}$ и $Mn^{2+}$ (Vasington et al., 1972) и неконкурентный характер торможения кальциевого насоса митохондрий (Reed, Bygrave, 1974a). Была продемонстрирована неоднородность коммерческого препарата рутениевого красного, содержащего в ряде случаев до 9 компонентов (Reed, Bygrave, 1974 b), способность его взаимодействовать с широким спектром соединений, в частности с фосфолипидами, а также некоторые другие побочные эффекты. Тем не менее, этот краситель, ставший популярным не только в цитохимии, но и в мембранологии, является наиболее избирательным инструментом для блокирования митохондриального транспорта $Ca^{2+}$, не затрагивающим другие типы кальциевых насосов (Ach, Bigrave, 1977).

Мы определили, что комплексное соединение ГАК, также взаимодействующее с анионными группами гликозамингликанов, аналогично рутениевому красному специфически тормозит митохондриальный транспорт $Ca^{2+}$ (полумаксимальное ингибирование в присутствии 6 нмолей ГАК/мг белка) и $Sr^{2+}$ (полумаксимальное торможение в присутствии 30 нмолей ГАК/мг белка). Торможение транспорта $Ca^{2+}$ имеет конкурентную природу с константой ингибирования $6 \cdot 10^{-6}$ М ГАК. В концентрациях 3—120 мкМ это соединение не влияло на дыхание, окислительное фосфорилирование и другие энергозависимые функции митохондрий.

Наряду с селективными ингибиторами системы транспорта двухвалентных катионов в митохондриях, описанными выше, имеются и неспецифические агенты, действие которых направлено на цепь переноса электронов или механизм трансформации энергии. Ниже представлена схема действия некоторых ингибиторов на транспорт двухвалентных катионов. Ингибирующий эффект обозначен пунктирными стрелками.

ДНФ и другие разобщители-протонофоры (FCCP, ТТФБ) индуцируют протонную проводимость мембраны митохондрий, вызывая снижение мембранного потенциала и торможение всех зависящих от него функций: транспорта ионов, синтеза АТФ, обратного переноса электронов и т. д. (Liberman, Skulachev, 1970).

Механизм действия олигомицина заключается в блокировании АТФазного комплекса митохондрий, в результате чего тормозится как синтез, так и гидролиз АТФ. Использование соединений этого типа в сочетании с ингибиторами переноса электронов —




классический прием идентификации механизма энергизации ионных насосов. С помощью инъекции животным разобщающих агентов (ДНФ, пентахлорфенол) получены данные об энергозависимом характере аккумуляции $Ca^{2+}$ и $Sr^{2+}$ в интактных клетках и «предоминантной» роли митохондрий в регуляции внутриклеточного кальция (Carafoli, 1967; Patriarca, Carafoli, 1969; Carafoli, et al., 1969). Другие авторы (Shaffer et al., 1972) для выявления роли митохондрий в $Ca^{2+}$-цикле изолированного функционирующего сердца использовали олигомицин, ингибирующий АТФ-зависимый транспорт $Ca^{2+}$ в митохондриях, но не влияющий на кальциевые насосы ретикулума и плазматических мембран. ДНФ и олигомицин были использованы также при изучении роли окислительного фосфорилирования в процессе всасывания $Ca^{2+}$ и $Sr^{2+}$ в желудочно-кишечном тракте (Тейлор, 1971) и при исследовании «массивной» аккумуляции стронция в изолированных митохондриях (Carafoli et al., 1965; Carafoli, 1965a, b).

## ОСОБЕННОСТИ АККУМУЛЯЦИИ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ И СТРОНЦИЯ В САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКОМ РЕТИКУЛУМЕ

Электрофоретический механизм транспорта двухвалентных катионов в митохондриях, как отмечалось во введении, является одним из элементов интегральной системы, регулирующей внутриклеточный ионный состав и, в частности, уровень $Ca^{2+}$. К настоя-

щему времени доказано существование $Ca^{2+}$-насосов в эндоплазматическом ретикулуме и плазматических мембранах, причем главным элементом этих насосов является $Ca^{2+}$-активируемая АТФаза (Weber et al., 1966; Martonosi, 1972; Ташмухамедов, Гагельганс, 1973; MacLennan, Holland, 1975). Соотношение вкладов митохондриального и немитохондриальных механизмов транспорта $Ca^{2+}$ в регуляцию внутриклеточного уровня этого катиона зависит от ткани и органа, эволюционного положения организма и, по-видимому, других факторов.

Транспорт $Ca^{2+}$ в ретикулуме и плазматических мембранах обеспечивается, очевидно, ферментативной системой переноса ($Ca^{2+}$-АТФаза), циклически изменяющей сродство к $Ca^{2+}$ в процессе фосфорилирования — дефосфорилирования молекулы АТФазы. Этот механизм, в отличие от митохондриального, не является электрофоретическим и не связан с мембранным потенциалом. Наряду с этим, в литературе имеются данные, свидетельствующие о формировании мембранного потенциала (положительная полярность внутри везикул) в процессе транспорта $Ca^{2+}$ через мембраны саркоплазматического ретикулума (Akerman, Wolf, 1979; Печатников и др., 1979) или протеолипосом, в которые встроена Са-АТФаза ФСР (Zimniak, Racker, 1978). В последнем случае при генерации внутри протеолипосом более отрицательного потенциала (в норме +60 мВ) в результате индукции оттока $K^{+}$ из везикул или внесения в среду жирорастворимых анионов поглощение $Ca^{2+}$ увеличивалось. В отличие от протеолипосом, мембраны фрагментированного саркоплазматического ретикулума обладают более высокой проницаемостью для ионов $K^{+}$ и анионов хлора, поэтому не исключено, что положительный потенциал внутри везикул ФСР, генерируемый во время транспорта $Ca^{2+}$ или в отсутствие транспорта (Печатников и др., 1979), компенсируется одновременным входом хлора или выходом $K^{+}$ или $Mg^{2+}$ (Beeler, Martonosi, 1979). Тем не менее, первичный электрогенный характер транспорта $Ca^{2+}$, осуществляемого Са-АТФазой ретикулума, по-видимому, можно считать доказанным (Akerman, Wolf, 1979).

Менее ясны эксперименты, продемонстрировавшие АТФ-зависимую генерацию градиента pH на мембране саркоплазматического ретикулума (Madeira, 1978). Этот градиент $H^{+}$, направленный наружу везикул, Madeira расценивает как движущую силу транспорта $Ca^{2+}$ в ФСР, однако эта точка зрения не подтверждается результатами его собственных и литературных данных о неэффективности разобщителей-протонофоров на аккумуляцию $Ca^{2+}$ в этой мембранной системе.

Предполагается, что кальциевый насос ретикулума состоит из канала, обеспечивающего трансмембранный перенос катионов, компонента, придающего насосу высокую ионную селективность, и системы энергизации кальциевого насоса (Shamoo, Goldstein, 1977). Опыты по реконструкции механизма транспорта $Ca^{2+}$, про-

веденные в лаборатории Racker (Racker, 1972; Zimniak, Racker, 1978), позволяют считать, что основные функции насоса могут обеспечиваться молекулой Ca-АТФазы, поскольку встраивание этого фермента в мембраны липосом — достаточное условие реконструкции кальциевого насоса.

Механизм транспорта $Ca^{2+}$ в ретикулуме обладает высокой селективностью: среди многочисленных двухвалентных катионов, по-видимому, только $Sr^{2+}$ может аккумулироваться в ретикулуме с помощью кальциевого насоса (Mermier, Hasselbach, 1976).

Впервые феномен аккумуляции ионов стронция в саркоплазматическом ретикулуме исследовали Van der Kloot, Glovsky, (1965), а также Weber et al. (1966). Наряду с секвестрацией этого катиона в цистернах ретикулума, авторы установили наличие $Ca^{2+}/Sr^{2+}$-обмена (Weber et al., 1966) и торможение стронцием аккумуляции $Ca^{2+}$ (Van der Kloot, Glovsky, 1965). Отложение стронция в саркоплазматическом ретикулуме спонтанно сокращающихся гладких мышц было зафиксировано с помощью электронномикроскопической техники (Somlyo, Somlyo, 1971). Высокая электронная плотность стронция делает его удобным инструментом для исследования кальций-аккумулирующих систем в тех типах клеток, где $Ca^{2+}$ выполняет важную регуляторную функцию.

По данным Mermier, Hasselbach (1976), аккумуляция $Ca^{2+}$ в ретикулуме проходит 2 фазы — быструю и медленную. АТФ-зависимое накопление стронция в ФСР является однофазным и проходит с большей скоростью, чем быстрая фаза поглощения $Ca^{2+}$. Эффективность насоса при транспорте ионов стронция составляет 1 $Sr^{2+}$ на 1 молекулу гидролизованного АТФ. В случае $Ca^{2+}$ эта величина равна 2. Другое отличие заключается в том, что аккумуляция стронция в ретикулуме пропорциональна концентрации наружного $Sr^{2+}$ даже в миллимолярной области, тогда как ионы кальция в концентрации выше $1 \cdot 10^{-5}$ М тормозят активность $Ca^{2+}$-насоса. Этот эффект ионов $Ca^{2+}$, очевидно, объясняется их тормозящим действием на скорость распада фосфорилированного интермедиата (EP) — промежуточной стадии процесса гидролиза АТФ $Ca^{2+}$-АТФазой (Yamada, Tonomura, 1972). Как показали эти авторы, $Sr^{2+}$ в 79 раз менее эффективен, чем $Ca^{2+}$ при активации АТФазы; именно по этой причине $Ca^{2+}$-АТФаза более устойчива к высоким концентрациям стронция.

Аккумуляция стронция в саркоплазматическом ретикулуме имеет, по-видимому, специальную роль в физиологии мышц ракообразных (Van der Kloot, Clovsky, 1965), однако исследование поглощения $Sr^{2+}$ представляет интерес и при выяснении активности отдельных $Ca^{2+}$-транспортирующих систем в условиях in vivo (Carafoli, 1967) или in situ (Somlyo, Somlyo, 1971), кинетики и механизма $Ca^{+2}$-насоса ретикулума из тканей млекопитающих.

$Sr^{2+}$ может активно транспортироваться и с помощью другого $Ca^{2+}$-насоса, локализованного в плазматических мембранах, ак-

тивируя скорость гидролиза АТФ мембраносвязанной Ca-АТФ-азой и проявляя одинаковую с $Ca^{2+}$ чувствительность к ингибиторам транспорта (Wins, Schoffeniels, 1968; Olson, Cazort, 1969). Таким образом, все типы кальциевых насосов: митохондрий, ретикулума, плазматических мембран,— обладают сродством к стронцию как аналогу кальция. Примерно такое же отношение к $Sr^{2+}$ наблюдается у некоторых $Ca^{2+}$-связывающих белков и ионофорных соединений, изолированных из митохондрий, саркоплазматического ретикулума, микроорганизмов и т. д.

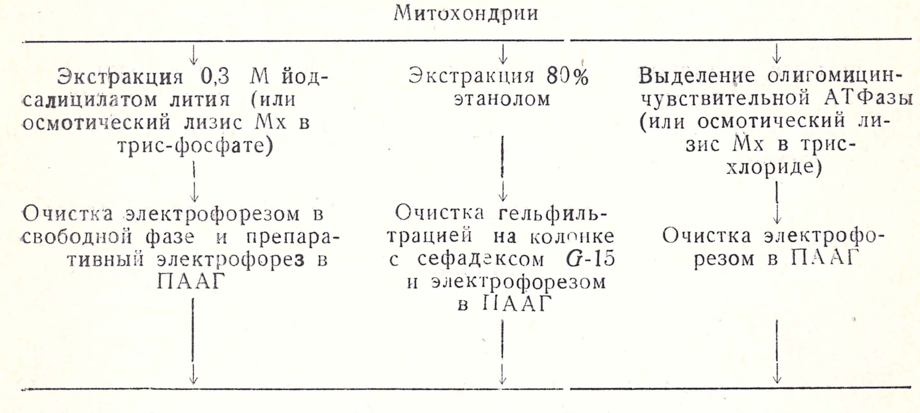
## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ДВУХВАЛЕНТНЫХ КАТИОНОВ С ИЗОЛИРОВАННЫМИ КОМПОНЕНТАМИ $Ca^{2+}$-ТРАНСПОРТИРУЮЩИХ СИСТЕМ МИТОХОНДРИЙ И САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА

В литературе высказывались различные предположения относительно участия анионных групп белков, гликопротеидов и фосфолипидов в связывании и транспорте двухвалентных катионов (Ташмухамедов, Гагельганс, 1973; Tyson et al., 1976; Shamoo, Goldstein, 1977). Применительно к митохондриям одним из первых указаний на существенную роль гликопротеидов в транслокации $Ca^{2+}$ явилось обнаружение ингибирующего эффекта низких концентраций рутениевого красного на энергозависимый транспорт $Ca^{2+}$ или $Sr^{2+}$. Селективность этого красителя, используемого для гистохимического выявления мукополисахаридов, позволила выдвинуть предположение о гликопротеидной природе митохондриального переносчика двухвалентных катионов (Moore, 1971, 1972; Vasington et al., 1972). Действительно, в ряде лабораторий вслед за этим были изолированы факторы, связывающие $Ca^{2+}$ по механизму высокого сродства (константа стабильности комплекса с $Ca^{2+}$ составляет $1 \cdot 10^6—1 \cdot 10^7$ $M^{-1}$) и имеющие гликопротеидную или гликопептидную природу (Tashmukhamedov et al., 1972; Sottocasa et al., 1972; Gomez-Puyou et al., 1972). Важной характеристикой этих компонентов является чувствительность $Ca^{2+}$-связывающих центров к действию лантанидов, рутениевого красного или ГАК в концентрациях, сопоставимых для интактных митохондрий. Существенно, что гликопротеиды с подобным сродством к $Ca^{2+}$ отсутствуют в митохондриях, генетически лишенных системы транспорта $Ca^{2+}$ с характеристиками, описанными для митохондрий печени крыс, как наиболее типичного случая (Carafoli, 1974, 1975). Ионы стронция и марганца (но не магния) конкурируют с $Ca^{2+}$ за участки связывания высокого сродства, локализованные в гликопротеидах; наряду с этим обнаружены конформационные изменения $Ca^{2+}$-связывающих факторов при взаимодействии с двухвалентными катионами (Panfili et al., 1974). Недавно в лаборатории Sottocasa (Panfili et al., 1976; Sottocasa et al., 1977) было показано, что антитела к $Ca^{2+}$-связывающему

гликопротеиду блокируют транспорт $Ca^{2+}$ в изолированных митохондриях. В пересчете на 1 мг белка митохондрий 50% торможение транспорта $Ca^{2+}$ в интактных митохондриях достигалось в присутствии 12 мкг антител, в то время как при использовании митопластов — митохондрий, лишенных наружной мембраны,— аналогичный эффект обеспечивали 1,5 мкг антител (Sottocasa et al., 1977). По-видимому, наружная мембрана является своеобразным «барьером», препятствующим взаимодействию гликопротеидных антител с внутренней мембраной, в которой локализована система транспорта $Ca^{2+}$. Этот факт можно расценивать как дополнительное доказательство важной роли гликопротеидов в митохондриальном транспорте двухвалентных катионов. Однако более важное значение имеют, по-видимому, эксперименты с реконструкцией кальциевого транспорта как на модельных системах, так и на некоторых типах митохондрий, не имеющих «ортодоксального» $Ca^{2+}$-насоса.

Prestipino et al. (1974) установили, что в присутствии миллимолярных концентраций $Ca^{2+}$ или $Sr^{2+}$ кальций-связывающий гликопротеид в концентрации $1{,}48 \cdot 10^{-7}$ М/л вызывает увеличение проводимости бислойных фосфолипидных мембран, причем рутениевый красный ($1 \cdot 10^{-6}$ М) снимает эффект гликопротеида. В отсутствие добавленных извне двухвалентных катионов или при использовании других гликопротеидов изменения сопротивления бислоев не наблюдалось. Вместе с тем, не было зафиксировано потенциала при десятикратном градиенте $Ca^{2+}$ на бислойной мембране (Prestipino et al., 1974) или индукции потока $Ca^{2+}$ через мембраны липосом, обработанных гликопротеидом (Карафоли, 1977, устное сообщение). По-видимому, в использованных этими авторами условиях выделения гликопротеида и тестирования его мембранной активности комплекс $Ca^{2+}$ — гликопротеид формирует в бислоях малоизбирательный канал проводимости. Сомнение относительно функционирования гликопротеида в качестве переносчика двухвалентных катионов возникает также при анализе величин кажущейся $K_м$ по кальцию. В случае интактной системы транспорта $Ca^{2+}$ в митохондриях эта величина составляет около 4 мкМ $Ca^{2+}$ (Reed, Bygrave, 1975), в то время как в модельной системе бислой—гликопротеид — около 1 мМ $Ca^{2+}$. Таким образом, интактный механизм транспорта $Ca^{2+}$ в митохондриях в 100—1000 раз более чувствителен к $Ca^{2+}$, чем его модель на лецитиновых мембранах, описанная Prestipino et al. (1974). Однако в экспериментах, выполненных в лаборатории Ю. В. Евдотиенко (Азарашвили и др., 1978) при процедуре выделения гликопротеида из митохондрий, несколько отличной от ранее описанной, удалось провести более успешную реконструкцию системы транспорта $Ca^{2+}$ на бислойных липидных мембранах. В модельной системе, как и в нативной, перенос $Ca^{2+}$ через мембрану был электрогенным и подчинялся уравнению Нернста; градиент KCl, в отличие от $CaCl_2$, не приводил к генерации потенциала.

Приводим схему выделения $Ca^{2+}$-связывающего гликопротеида (ГП) и его связь с механизмом транспорта $Ca^{2+}$ в митохондриях. БФМ — бислойная фосфолипидная мембрана, МП — мембранный потенциал, ПААГ — полиакриламидный гель, $A_{50}$ — полумаксимальная активность, Мх — митохондрии.




$Ca^{2+}$-связывающий гликопротеид (м. в. 35—40 тыс.), содержащий белок и углеводы (и фосфолипиды)

| | | |
|---|---|---|
| $Ca^{2+}$ или $Sr^{2+}$-зависимая индукция проводимости БФМ, чувствительная к рутениевому красному. Отсутствие МП при градиенте кальция на БФМ (Prestipino et al., 1974). Антитела к ГП тормозили транспорт кальция в интактных Мх ($A_{50}$-12 мкг/мг белка Мх) и митопластах ($A_{50}$-1,5 мкг/мг белка митопластов) (Sottocasa et al., 1977) | Увеличение проводимости БФМ в присутствии 5 мМ $CaCl_2$. Генерация МП при градиенте кальция, согласно уравнению Нернста. Блокирование тиоловых групп ГП снимает его мембраноактивные свойства (Миронова и др., 1979) | Увеличение проводимости БФМ в присутствии $CaCl_2$, но не KCl. Генерация МП при наличии градиента кальция 23—25 мВ (Азарашвили и др., 1978) |

Миронова и др. (1979) выделяли гликопротеид из митохондрий сердца путем спиртовой экстракции с последующей гельфильтрацией и электрофорезом. Очищенный гликопротеид имел м. в. около 40 тыс., содержал серу и в концентрации $1 \cdot 10^{-6}$ М/л избирательно транспортировал $Ca^{2+}$ через бислойные липидные мембраны, причем перенос $Ca^{2+}$ также был электрогенным. Не исключено, что ранее описанный этой группой исследователей (Миронова и др., 1976) низкомолекулярный серусодержащий пептид (табл. 1) является фрагментом гликопротеида. Таким образом, мембраноактивные свойства митохондриального гликопротеида как индуктора проницаемости для $Ca^{2+}$ существенно зависят от

процедуры выделения этого компонента внутренних мембран митохондрий. Тем не менее, его функциональная роль в митохонд-

Таблица 1

**Кальцийсвязывающий „ионофорный“ материал, выделенный из митохондрий в различных лабораториях**

| Ионофор и его характеристика | Система тестирования и ионная селективность | Примечания |
|---|---|---|
| Низкомолекулярный гидрофобный ионофор двухвалентных катионов (Blondin, 1974 г. Махмудова и др., 1975). М. в. 600—800. Триптический гидролиз Мх, экстракция смесью бутанол: уксусная кислота: вода, очистка хроматографией на колонке. | Индукция переноса $Ca^{2+}$ и $Mg^{2+}$ через мембраны Мх, БФМ и в ячейке Прессмана Эффекты на БФМ предотвращаются $La^{3+}$. | Обмен $Ca^{2+}/H^{+}$ |
| Серусодержащий пептид (Миронова и др., 1976). Экстракция Мх этанолом, очистка бумажной и колоночной хроматографией. М. в. около 1500. | $La^{3+}$-чувствительное снижение сопротивления БФМ в присутствии $Ca^{2+}$, $Mg^{2+}$. | Мембранный потенциал подчиняется уравнению Нернста. |
| Липидный компонент мембран Мх (Кудзина и др., 1977). Экстракция Мх хлороформ-метанолом по Фолчу. | $La^{3+}$ снимает проводимость БФМ, индуцированную $Ca^{2+}$. Избирательность; $Ca^{2+} > Sr^{2+} \geqslant Mg^{2+} > > K^{+}$. | 10-кратный градиент кальция индуцирует мембранный потенциал 27 мВ. |
| Пептид из 17 аминокислотных остатков (Blondin et al., 1977). Экстракция лиофилизированных Мх хлороформ-метанолом, выделение „ионофоропротеина“ (м. в. 10 тыс. дальтон), гидролиз его трипсином и выделение „ионофоропептида“ (м. в. 5100), выделение из него „ионофора“ (м. в. 1600). | Увеличение проницаемости мембран для $Ca^{2+}$ или $K^{+}$. Изменение флуоресценции АНС в комплексах ионофор-катион (Ca:Na:Mg:K=1:0,6:0,26:0,21) | Электрогенный механизм переноса $Ca^{2+}$ или $K^{+}$. |
| „Кальцифорин“—углеводсодержащий пептид (м. в. 3000) (Jeng et al., 1978). Экстракция митопластов дезоксихолатом, разделение экстракта на колонке с сефадексом G-50. | Экстракция двухвалентных катионов в органическую фазу, перенос $^{45}Ca^{2+}$ в ячейке Прессмана. Селективность: Zn: Sr: Ca: :Mn: Na: Rb= 1,9:1,3:1,0:0,2:0,17:0,02. | Обмен $Ca^{2+}/H^{+}$, нейтральный комплекс белок—Са. |

риальном транспорте $Ca^{2+}$ в настоящее время недостаточно ясна. Возможно, он выполняет функцию рецептора и примембранного

«накопителя» двухвалентных катионов, в то время как гидрофобный домен этой молекулы или какие-либо прочно связанные с ней гидрофобные компоненты служат каналом, обеспечивающим трансмембранный электрофорез двухвалентных катионов.

Из митохондрий выделены и другие соединения, по-видимому, также имеющие непосредственное отношение к механизму транспорта ионов $Ca^{2+}$ (табл. 1). В частности, Blondin (1974, 1975) из митохондрий сердца быка изолировал липофильную фракцию, которая индуцировала увеличение проницаемости мембран мито-

Таблица 2

**Эффект ионов лантана на кальциевую проводимость бислойных фосфолипидных мембран, индуцированную митохондриальным ионофором двухвалентных катионов***

| № экспери-мента | Концентрация | | | Удельная проводимость БФМ, Go, $ом^{-1} \cdot см^{-2}$ ($\times 1 \cdot 10^{9}$) |
|---|---|---|---|---|
| | $Ca^{2+}$, мМ | ИДК, мкг/мл | $La^{3+}$, мкМ | |
| 1 | 0** | 0 | 0 | 3,5 |
| 2 | 0 | 2,7 | 0 | 8 |
| 3 | 0 | 54 | 0 | 20 |
| 4 | 0,33 | 54 | 0 | 50 |
| 5 | 3,3 | 54 | 0 | 150 |
| 6 | 3,3 | 54 | 3,3 | 5 |

* Среда, омывающая мембраны, содержала 25 мМ трис-хлорида, pH = 7,0. Мембраны формировали из суммарных фосфолипидов мозга быка.

** Имеется в виду добавленный извне $Ca^{2+}$, примесь $Ca^{2+}$ в растворах (около $5 \cdot 10^{-6}$ М) не учитывалась.

хондрий для ионов магния и кальция, а также стимулировала скорость переноса $^{45}Ca^{2+}$ через слой четыреххлористого углерода. В нашей лаборатории (Махмудова и др., 1975) впервые было показано, что эта фракция со свойствами ионофора двухвалентных катионов (ИДК) вызывает в присутствии $Ca^{2+}$ лантанидчувствительное снижение сопротивления бислойных мембран, сформированных из фосфолипидов мозга (табл. 2). При 10-кратном концентрационном градиенте $Ca^{2+}$ на мембране (0,36 и 3,6 мМ $CaCl_2$ соответственно) наблюдалась генерация мембранного потенциала 15—17 мВ. Анализ ИК-спектров комплексов ИДК с ионами лантана и кальция показывает, что положительный заряд лантана экранирует диполи полярных групп ИДК, участвующих в комплексообразовании с $Ca^{2+}$.

Позднее в лаборатории Ю. В. Евдотиенко (Кудзина и др., 1977) исследованы свойства бислоев, сформированных из липид-

ных компонентов митохондрий печени крыс. Эта модельная система проявляла селективность, которая была представлена рядом: $Ca^{2+} > Sr^{2+} \geqslant Mg^{2+} > K^{+}$, причем лантан ($5 \cdot 10^{-5}$ М/л) ингибировал увеличение проводимости, индуцированное ионами кальция. Десятикратный градиент $Ca^{2+}$ на мембране генерировал разность потенциалов величиной 29 мВ, т. е. близкую к теоретической. Таким образом, эта система воспроизводила избирательность исходного механизма транспорта двухвалентных катионов и его чувствительность к действию лантанидов, однако, как и в других рассмотренных выше работах, для демонстрации эффекта $Ca^{2+}$ или $Sr^{2+}$ на проводимость мембран требовались концентрации катионов, в тысячи раз превышающие кажущуюся $K_м$ интактной системы. Аналогичная ситуация, видимо, сложилась и в модельных экспериментах по индукции переноса двухвалентных катионов через слой органического растворителя в присутствии очищенного кардиолипина (Tyson et al., 1976), который рассматривался некоторыми авторами (Saris, 1972) как переносчик $Ca^{2+}$ через мембраны митохондрий. Кардиолипининдуцированный перенос $Ca^{2+}$ в ячейке Прессмана тормозился рутениевым красным или стронцием как конкурентом $Ca^{2+}$. Однако наличие такого переноса в митохондриальной мембране спорно. Во всяком случае, установлено, что антитела к кардиолипину не влияют на транспорт двухвалентных катионов (Saris, 1972; выступление Lehninger в дискуссии к докладу).

По данным Blondin (1975), роль ионофора двухвалентных катионов выполняют окси- и кетопроизводные октадекадиеновой кислоты, а также метиловые эфиры этих производных. Не исключено, что липидные соединения с ионофорными свойствами возникают в результате жесткой обработки митохондриального материала. Несмотря на исчерпывающую химическую характеристику ионофорного материала, представленную Blondin, и развитую несколько позднее концепцию об «ионофоропротеинах», в которой ионофор представлен не жирнокислотной субстанцией, а нейтральным пептидом (Blondin et al., 1977), проблема разделения и реконструкции механизма транспорта двухвалентных катионов в митохондриях фактически остается нерешенной. Отчасти это, видимо, обусловлено возможной поликомпонентностью ионтранспортирующих систем с высокой избирательностью, а также наличием в мембране митохондрий нескольких механизмов переноса $Ca^{2+}$ (см. введение). Некоторые варианты устройства подобных систем обсуждаются в обзорах В. П. Скулачева (1974), Ю. А. Овчинникова (1978), Shamoo, Goldstein (1977).

В 70-х годах достигнут существенный прогресс в реконструкции $Ca^{2+}$-насоса саркоплазматического ретикулума. Racker (1972) осуществил встраивание очищенной Са-АТФазы в липосомы, сформированные из фосфолипидов соевых бобов, в результате чего была реконструирована АТФ-зависимая аккумуляция $Ca^{2+}$ с признаками, свойственными интактной системе транспорта. Несколько

лет спустя Shamoo, MacLennan (1974) обнаружили «ионофорные» свойства водорастворимой сукцинилированной Ca-АТФазы ретикулума при использовании бислойных фосфолипидных мембран. Относительные изменения проводимости мембран, модифицированных ионофором, могут быть представлены последовательностью: $Ba^{2+} > Ca^{2+} > Sr^{2+} > Mg^{2+} > Zn^{2+} >$ $Na^{+}$, $K^{+}$, $Cs^{+}$, $Li^{+}$ и $Rb^{+}$. За исключением бария, селективность этой модельной системы и интактного кальциевого насоса ФСР совпадают и близки к ионной избирательности карбоксилатного ионофора X-537 A (Caswell, Pressman, 1972). Проводимость, индуцированная двухвалентными катионами в присутствии сукцинилированной Ca-АТФазы, блокировалась лантаном и рутениевым красным (Shamoo, MacLennan, 1974; Shamoo, Goldstein, 1977). Эти результаты были воспроизведены в нашей лаборатории (Tashmukhamedov et al., 1975). Следует отметить, что препарат сукцинилированного фермента не проявляет АТФазной активности, а для индукции им мембранных эффектов требуются миллимолярные концентрации двухвалентных катионов, что в $10^3$—$10^4$ раз выше концентраций, активирующих $Ca^{2+}$-насос ретикулума. Однако наиболее важным в исследованиях Shamoo, Goldstein (1977) является демонстрация ионофорного, гидролитического и «канального» фрагментов в молекуле Ca-АТФазы с молекулярным весом 20 тыс., 30 тыс. и 45 тыс. дальтон соответственно, причем ионную селективность насоса регулирует фрагмент с молекулярным весом 20 тыс., а канал, формируемый участком в 45 тыс., малоизбирателен. В целом этот подход, наряду с реконструкцией кальциевого насоса на липосомах, можно рассматривать как обоснованную предпосылку расшифровки не только молекулярного механизма работы Ca-АТФазы саркоплазматического ретикулума, но и выявления наиболее общих принципов ионного транспорта через различные типы биологических мембран.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование особенностей транспорта ионов кальция или стронция через биологические мембраны представляет интерес не только при оценке селективности тех или иных кальциевых насосов, локализованных в соответствующих мембранных системах, но и при выявлении наиболее существенных каналов и механизмов, с помощью которых стронций проникает в организм животных и вовлекается в биологические цепи.

Анализ взаимодействия щелочноземельных металлов с различными типами кальциевых насосов показывает, что стронций является ближайшим, весьма конкурентоспособным аналогом $Ca^{2+}$. $Sr^{2+}$ может заменять $Ca^{2+}$ и вести себя подобно ему при аккумуляции в митохондриях, саркоплазматическом ретикулуме, при транспорте через плазматические мембраны. Сходство механизмов транспорта ионов кальция и стронция, а также некоторые

кинетические константы активного транспорта этих ионов в тех случаях, когда они измеримы, являются в основном величинами одного порядка для обоих ионов. Более того, слабо дискриминируют $Ca^{2+}$ и $Sr^{2+}$ изолированные компоненты кальциевых насосов и реконструированные на их основе модельные системы.

В поведении $Ca^{2+}$ и $Sr^{2+}$ при взаимодействии с секвестрирующими мембранными системами наблюдаются существенные различия. Наиболее важным следует признать стабилизирующий эффект стронция на структуру и функцию митохондрий, противоположный тому, который оказывает на них кальций. Существуют и другие отличия в кинетике транспорта $Ca^{2+}$ и $Sr^{2+}$ в митохондриях и саркоплазматическом ретикулуме; они рассмотрены в соответствующих разделах настоящего обзора.

В связи с существенной ролью эндогенных фосфолипаз в регуляции структурного и функционального состояния митохондрий, особенно при экстремальных воздействиях, представляет интерес специфика влияния ионов кальция и стронция на активность этого фермента. Активирующее действие $Ca^{2+}$ на митохондриальную фосфолипазу в настоящее время доказано, вместе с тем, некоторые косвенные данные и аналогии с фосфолипазами из других источников свидетельствуют об ингибирующем эффекте ионов стронция. Прямая демонстрация тормозящего действия $Sr^{2+}$ на фосфолипазу митохондрий, по-видимому, необходима при решении вопроса о механизме стабилизирующего эффекта этого катиона на структуру митохондрий.

Физиологическое значение транспорта $Ca^{2+}$ в митохондриях, по мнению многих авторов (Rasmussen, 1966; Lehninger, 1970; Ташмухамедов, Гагельганс, 1973; Carafoli, 1974, 1975; Bygrave, 1977), заключается не только в регуляции мышечного сокращения или в контроле активности некоторых клеточных ферментов и ферментных систем, но и в термогенезе, биологической кальцификации тканей, наблюдающейся как в норме, так и при некоторых спонтанных и экспериментальных патологиях, и т. д. При достаточно высоком уровне стронция в пище митохондриальный и другие типы кальциевых насосов, а также некоторые $Ca^{2+}$-связывающие белки могут вовлекаться в «стронцификацию» тканей. Это явление, очевидно, имеет характер физиологического процесса у ряда эволюционно древних организмов, и в данном случае взаимодействие $Sr^{2+}$ с мембранными структурами представляет самостоятельный интерес.

Однако и в случае эволюционно более высоких форм организмов стронций может быть использован как аналог $Ca^{2+}$, например для электронномикроскопической маркировки внутриклеточных кальциевых депо, при изучении механизма автоколебаний ионных потоков в митохондриях, в экспериментах по изучению механизма транспорта $Ca^{2+}$ в митохондриях и т. д. Несомненно, что со временем перечень примеров использования стронция в качестве инструмента исследования внутриклеточного обмена кальция существенно расширится.

## ЛИТЕРАТУРА


Азарашвили Т., Лукьяненко А. И, Евтодиенко Ю. В. 1978. «Биохимия», 43, 1139—1142.

Бендол Дж. 1970. Мышцы, молекулы и движение. М.

Болдырев А. А. 1977. Биохимические аспекты электрохимического сопряжения. М.

Виноградов А. Д., Евтодиенко Ю. В. 1967. Митохондрии. Биохимия и морфология. М., 5—18.

Гюльханданян А. В., 1978. Исследование автоколебаний ионных потоков в митохондриях. Автореф. канд. дис. Пущино-на-Оке.

Евтодиенко Ю. В. 1979. Механизмы и регуляция транспорта ионов в митохондриях. Автореф. докт. дис. Пущино-на-Оке.

Кудзина Л. Ю. и др. 1977. «Биофизика», **22**, 362—364.

Ленинджер А. Д. 1966. Митохондрия. Молекулярные основы структуры и функции. М.

Махмудова Э. М. и др. 1975. «Биофизика», **20**, 225—227.

Миронова Г. Д. и др. 1976. Биохимия митохондрий. М., 143.

Миронов Г. П. и др. 1979. Тезисы докл. I Советско-швейцарского симпозиума «Биологические мембраны. Структура и функции». Тбилиси, **78**.

Овчинников Ю. А., Иванов В. Т., Шкроб А. М. 1974. Мембраноактивные комплексоны. М.

Овчинников Ю. А. 1978. Итоги и перспективы развития биоорганической химии и молекулярной биологии. М., 128—169.

Печатников В. А. и др. 1979. Тезисы докл. I Советско-швейцарского симпозиума «Биологические мембраны, структура и функции». Тбилиси, 105.

Ритов В. Б. 1977. Молекулярная организация и механизм функционирования $Ca^{2+}$-зависимой АТФазы саркоплазматического ретикулума. «Итоги науки и техники. Биологическая химия». **XI**, М., 5—77.

Скулачев В. П. 1969. Аккумуляция энергии в клетке. М.

Скулачев В. П. 1972. Трансформация энергии в биомембранах. М.

Скулачев В. П. 1974. «Успехи совр. биологии», **77**, 125.

Сороковой В. И., Владимиров Ю. А. 1975. Молекулярная патология мембранных структур. «Биофизика». **5**, 11—55.

Ташмухамедов Б. А., Гагельганс А. И. 1970. О колебательном характере выхода $H^+$ из митохондрий во время аккумуляции стронция. «Биофизика», **15**, 443—446.

Ташмухамедов Б. А., Гагельганс А. И. 1973. Активный транспорт ионов через биологические мембраны. Ташкент.

Тейлор Д. М. 1971. Метаболизм стронция. М., 170—175.

Холмухамедов Э. Л. 1979. Количественный анализ и изучение механизма автоколебаний ионных потоков в митохондриях. Автореф. канд. дис. Пущино-на-Оке.

Холмухамедов Э. Л., Гюльханданян А. В. 1976. В кн. «Биохимия митохондрий». М., 147.

Хассельбах В., Вебер Г. 1964. Молекулярная биология. Проблемы и перспективы. М., 237.

Чанс Б. 1962. Регуляция клеточного обмена. М., 111—153.

Akerman K. E. O. 1978. FEBS Letters, **93**, 293—296.

Akerman K. E. O. 1979. FEBS Letters, **100**, 291—295.

Ash G. R., Bygrave F. L. 1977, FEBS Letters, 78, 166—168.

Azzone G. F. 1977. FEBS Letters, **78**, 21—24.

Bartey W., Amoore J. E. 1958. Biochem. J., **69**, 348—360.

Beeler T., Martonosi A. 1979. FEBS Letters, **98**, 173—176.

Blondin G. A. 1974. Biochem. Biophys. Res. Communs, **56**, 97—105.

Blondin G. A. 1975. Ann. N. Y. Acad. Sci, **264**, 98—111.

Blondin G. A., Kessler R. J., Green D. E. 1977. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74**, 3667—3671.

Boyer P. D. 1965. Oxidases and related Redox Systems (T. E. King, H. S. Mason, and M. Morrison, eds), **1**, 994—1008, Wiley, New York.
Boyer P. D. 1975. FEBS Letters, **58**, 1—6.
Brierley G. P. et al. 1963. J. Biol. Chem., **238**, 3482—3489.
Bygrave F. L. 1977. Current Topics in Bioenegretics, 6, 259—318.
Caplan A. I., Carafoli E. 1965. Biochim. Biophys. Acta, **104**, 317—329.
Carafoli E. 1965a. Biochim. Biophys. Acta, **97**, 99—106.
Carafoli E. 1965b. Biochim. Biophys. Acta, **97**, 107—117.
Carafoli E. J. 1967. Gen Physiol., **50**, 1849—1864.
Carafoli E. 1973. Biochimie, **55**, 755—762.
Carafoli E. 1974. Biochem. Soc. Symp., **39**, 89—109.
Carafoli E. 1975. Mol. Cell. Biochem., **8**, 133—140.
Carafoli E. 1977. Living Systems as energy converters, 153—174.
Carafoli E. 1979.FEBS Letters, **104**, 1—5.
Carafoli E., Weiland S., Lehninger A. L. 1965. Biochim. Biophys. Acta, **97**, 88—98.
Carafoli E., Gamble R. L., Lehninger A. L. 1966, J. Biol. Chem., **241**, 2644—2652.
Carafoli E., Patriarca P., Rossi C. S. 1969. J. Cell. Physiol., 74, 17—29.
Caswell A. H., Pressman B. C. 1972. Biochem. Biophys. Res. Commūns, **49**, 292—298.
Chance B. 1965. J. Biol. Chem., **240**, 2729—2748.
Chance B., Mela L. 1966. Biochemistry, **5**, 3220—3223.
Chance B., Yoshioka T.. 1966. Arch. Biochem. Biophys., **117**, 451—465.
Chappell J. B., Cohn M., Greville G. D. 1963. Energy—linked Functions of Mitochondria (B. Chance, ed.), Acad. Press, New York, 219—231.
Chappell J. B., Crofts A. R. 1966. Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria (J. M. Tager. et al., eds), BBA Library, 7, Elsevier, Amsterdam, 293.
Crofts A. R.. Chappell J. B. 1965. Biochem. J., **95**, 387—392.
Deana R. et al 1979. FEBS Letters, 106, 231—234.
Drahota Z. et al. 1965. J. Biol. Chem., **240**, 2712—2720.
Drahota Z. et al. 1969. Arch. Biochem. Biophys., **130**, 267.
Gear A. L. et al. 1967. J. Biol. Chem., 242, 3403—3413.
Gomez-Puyou A. et al. 1972. Biochem. Biophys. Res. Communs, **47**, 814—819.
Greenawalt J. W., Carafoli E. 1966. J. Cell. Biol., **29**, 37—61.
Gylkhandanyan A. V. et al. 1976. FEBS Letters, **66**, 44—47.
Hasselbach 1964. Proc. Roy. Soc., **160**, 501.
Hasselbach W., Makinose M. 1961. Biochem. Z., 333, 518—528.
Hasselbach W., Makinose M. 1962. Biochem. Biophys. Res. Communs, **7**, 132.
Hasselbach W., Makinose M. 1963. Biochem. Z., **339**, 94—111.
Heaton G. M., Nicholls D. G. 1976. Biochem. J., **156**, 635—646.
Jeng A. Y., Ryan T. E., Shamoo A. E. 1978. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **75**, 2125—2129.
Lehninger A. L. 1949. J. Biol. Chem., **178**, 625—644.
Lehninger A. L. 1966. Ann. N. Y. Acad. Sci., **137**, 700—707.
Lehninger A. L. 1970. Biochem. J., **119**, 129—138.
Lehninger A. L. 1972. The molecular Basis of Flectron Trnasport. Acad. Press, N. Y.— London, 133—151.
Lehninger A. L., Carafoli E., Rossi C. S. 1967. Adv. Enzymol., **29**, 253—320.
Lehninger A. L. et al. 1969. Mitochondia. Struct. Funct. Eed. Eur. Biochem. Soc. Meet. 5th, 1968. FEBS Symp., **17**, 369—377.
Lehninger A. L., Carafoli E. 1971. Arch. Biochem. Biophys., **143**, 506—515.
Lettvin J. V. et al. 1964. Nature, **202**, 1338—1339.
Liberman E. A., Skulachev V. P. Biochim. Biophys. Acta, **216**, 30—42.
MacLennan D. H., Holland P. C. 1975. Ann. Rev. Biophys. and Bioenerg., **4**, 377—404.
Madeira V. M. C. 1978. Arch. Biochem. Biophys., **185**, 316—325.

Martonosi A. 1972. Metabolic Pathways. **6**. Metabolic Transport, 317—349.
Mela L. 1968. Arch. Biochem. Biophys., **123**, 286—293.
Mermier P., Hasselbach W. 1976. Eur J. Biochem., **69**, 79—86.
Mitchell P. 1961. Nature (London), **191**, 144—148.
Mitchell P. 1966. Chemiosmotic Coupling in Oxidative and Photosynthetic Phosphorylation. Glynn. Ress. Bodmin, Cornwall, England.
Mitçhell P. 1972. Bioenergetics, **3**, 5—24.
Moore C. L. 1971. Biochem. Biophys. Res. Communs, **42**, 298—305.
Moore C. L. Metabolic Pathways. Metabolic Transport (L. E. Hokin, Ed.). 6 573—626.
Moyle J., Mitchell P. 1977. FEBS Letters, **77**, 136—140.
Moyle J., Mitchell P. 1977. FEBS Letters, **73**, 131—136.
Mraz F. R. 1962. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **111**, 429—431.
Olson E. J., Cazort R. J. 1969. J. Cen. Physiol., **53**, 311—322.
Packer L., Utsumi K., Mustafa M. G. 1966. Arch. Biochem. Biophys., **117**, 381—393.
Panfili E., Sandri G., Sottocasa G. L. 1974. Acta Vitamin. Enzymol., **28**, 323—330.
Panfili E. et al. 1976. Nature, **5582**, 185—186.
Patriarca P., Carafoli E. 1969. J. Gen Physiol., **72**, 29—37.
Philipson D. D., Baumgartner F. 1979. Biochim. Biophys. Acta, **567**, 523—528.
Pieterson W. A., Volwerk J. J., De Haas G. H. 1974. Biochemistry, **13**, 1439—1445.
Potter P. R. 1947. J. Biol. Chem., **169**, 17—37.
Potter V. R., Siekevitz P., Simonson H. C. 1953. J. Biol. Chem., **205**, 893—908.
Prestipino G. et al. 1974. FEBS Letters, **45**, 99—103.
Racker E. 1972. J. Biol. Chem., **247**, 8198—8200.
Rasmussen H. 1966. Fed. Proc., **25**, 903—911.
Reed K. C., Bygrave F. L., 1974a. Biochem. J., **140**, 143—155.
Reed K. C., Bygrave F. L. 1974b. FEBS Letters, **46**, 109—114.
Reed K. C., Bugrave F. L. 1975. Biochem. J., **55**, 497—504.
Reynafarje B., Lehninger A. L. 1977. Biochem. Biophys. Res. Communs, **77**, 1273—1279.
Saris N. E. L. 1972. Biochemistry and Biophysics of mitochondrial Membranes (G. F. Azzone et al., eds) 641—652.
Scarpa A., Azzone G. F. 1970. Eur. J. Biochem., **12**, 328—335.
Scarpa A., Lindsay J. G. 1972. Eur. J. Biochem., **27**, 401—407.
Schaffer S., Safer B., Williamson J. R. 1972. FEBS Letters, **23**, 125—130.
Scherphof G. L. 1973. Abstracts of papers presented at the Simposium. «Calcium binding Proteins», Jablonna near Warsaw.
Sculachev V. P. 1971. Current Topics in Bioenergetics, **4**, 27—190.
Selwyn M. J., Dawson A. P., Dunnett S. J. 1970 .FEBS Letters, **10**, 1—5.
Shamoo A. E., MacLennan D. H. 1974. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **71**, 3522—3526.
Shamoo A. E., Goldstein D. A. 1977. Biochim. Biophys. Acta, **472**, 13—55.
Siekevitz P., Potter V. R. 1973. J. Biol. Chem., **200**, 187—196.
Slater E. C. 1953. Nature (London), **172**, 975—978.
Slater E. C., Cleland K. W. 1953. Biochem. J., **55**, 566—580.
Somlyo A. V., Somlyb A. P. 1971. Science, **174**, 955—958.
Somlyo A. P. et al. 1974. J. Cell. Biol., **61**, 723—742.
Sottocasa G. L. et al. 1972. Biochem. Biophys. Res. Communs, **47**, 808—813.
Sottocasa G. L., Panfili E., Sandri G. 1977. Calcified Tissues 1976, Leeds, 497—499.
Strong P. N. et al. 1976. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **73**, 178—182.
Tashmukhamedov B. A. et al. 1972. FEBS Letters, **28**, 239—242.
Tashmukhamedov B. A. 1975. Vth internat. Biophys. Congress, Copenhagen, Denmark, 174.
Tyson C. A., Zande H. V. Green D. E. 1976. J. Biol. Chem., **251**, 1326—1332.

Utsumi K., Packer L. 1967. Arch. Biochem. Biophys., **120**, 404—412.
Vainio H., Mela L., Chance B. 1970. Eur. J. Biochem., **12**, 387—391.
Vasington F. D. 1966. Biochem. Biophys. Acta, **113**, 414—416.
Vasington F. D., Murphy J. V. 1962. J. Biol. Chem., **237**, 2670—2677.
Vasington F. D. et al. 1972. Biochim. Biophys. Acta, **256**, 43—54.
Van der Kloot W. G., Glovsky J. 1965. Comp. Biochem. Physiol., **15**, 547—567.
Vinogradov A. D., Scarpa A. 1973. J. Biol. Chem., **248**, 5527—5531.
Weber A., Herz R., Reiss I. 1966. Biochem. Z., **345**, 329—369.
Wins P., Schoffeniels E. 1968. Life Sci., **7**, 673—681.
Yamada Sh., Tonomura Y. 1972. J. Biochem., **72**, 417—425.
Zimniak P., Racker E. 1978. J. Biol. Chem., **253**, 4631—4637.

З. У. БЕКМУХАМЕТОВА, А. К. КАСЫМОВ

# О МЕХАНИЗМАХ РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСПОРТА ИОНОВ В ПОЧКАХ

Транспорт ионов и водно-солевая регуляция в пределах организма у позвоночных осуществляются почкой, которой принадлежит исключительная роль в минеральном обмене у высших организмов. В связи с многообразием и сложностью почечных функций ее деятельность находится под контролем большого числа гормонов, которые тонко регулируют водно-солевой баланс в организме. Хорошо известны физиологические эффекты гормонов надпочечников и нейрогипофиза, однако молекулярные механизмы действия этих биологически активных веществ изучены недостаточно. Значительный интерес представляет исследование механизмов транспорта ионов в почечной ткани, так как сегменты нефрона обладают различной функциональной активностью. Особенности транспорта ионов в почке, по-видимому, связаны со спецификой Na, К-АТФазы отдельных сегментов нефрона.

## ТРАНСПОРТ ИОНОВ В РАЗЛИЧНЫХ ЗОНАХ ПОЧКИ

Функциональной единицей почки является нефрон, каждый сегмент которого выполняет специфические функции в процессе реабсорбции натрия. Визуально в почке различают корковую, мозговую и сосочковую зоны. В корковом слое расположены клубочки, проксимальные и дистальные отделы; в мозговой зоне — тонкие и толстые восходящие участки петли Генле; в сосочковой зоне находятся тонкие отделы петли Генле и собирательные трубочки.

Поскольку прямая зависимость между активностью транспортных процессов и уровнем транспортной АТФазы установлена на примере самых разнообразных тканей (Skou, 1957, 1962; Whittam, 1962; Bonting, 1970), мы исследовали активность Na, К-АТФазы в поверхностном слое коры, а также в мозговой и сосочковой зонах почки крыс.

Наши данные показали, что разные зоны почки обладают как общей, так и транспортной АТФазной активностью. Одновременно с нами аналогичные данные были получены Schmidt, Dubach (1969), Nechay et al. (1971).

Максимальная суммарная активность фермента наблюдается в мозговой зоне. Наибольшая активность транспортной АТФазы обнаруживается в мозговой и сосочковой зонах, наименьшая — в корковой.

Параллельно с распределением АТФазной активности мы исследовали внутриклеточную концентрацию электролитов в каждой зоне почки путем пересчета общей концентрации ионов натрия и калия с соответствующей поправкой на внеклеточное (инулиновое) пространство, которое составляло для корковой зоны $24,5 \pm 0,57$, для мозговой — $25,2 \pm 1,08$ и для сосочковой — $29,6 \pm 0,89\%$.

Клетки сосочковой зоны содержат максимальное количество натрия. Здесь его концентрация в несколько раз выше, чем в клетках корковой зоны. При этом внутриклеточная концентрация натрия повышается от корковой к мозговой и сосочковой зонам, тогда как концентрация калия уменьшается. Увеличение внутриклеточной концентрации ионов натрия от коры к папилле приводит к значительному нарастанию натриевого градиента между начальными сегментами нефрона, локализованными в основном в корковой зоне, и теми сегментами, которые составляют сосочковую зону — тонкими канальцами петли Генле и собирательными трубочками.

На рис. 1 представлено распределение ионов натрия и калия в клетках различных сегментов нефрона. При составлении этой схемы мы использовали также литературные данные (Burg, Grantham, 1971) о внутриканальцевом содержании ионов натрия, полученные методом микропункции и остановленного мочеотделения на изолированных нефронах. Анализ схемы показывает, что в проксимальной части нефрона ионы натрия входят из просвета канальцев через апикальную мембрану в клетку пассивно по концентрационному градиенту. На противоположных базальных мембранах клеток этого отдела нефрона ионы натрия выходят активно против высокого концентрационного градиента. Следует учитывать, что трансцеллюлярная разность потенциала в проксимальном отделе нефрона чрезвычайно низка и поэтому не может оказывать какого-либо влияния на реабсорбцию натрия.

В клетках дистальных канальцев, а в еще большей степени в клетках канальцев петли Генле и в собирательных трубочках, концентрация натрия выше, чем в просвете канальцев, поэтому вход натрия через апикальную мембрану в этих зонах нельзя объяснить простой диффузией. Если натрий активно реабсорбируется на протяжении всего нефрона, то следует ожидать наличия различных натриевых насосов в почке. Данные по этому вопросу в литературе довольно противоречивы, а экспериментальные ма-

териалы требуют дальнейшей проверки (Наточин, 1969—1976; Whittembury, 1970, 1972; Nechay et al., 1971; Torretti et al., 1972; и др.).

В сосочковой зоне почек на апикальных мембранах может находиться натриевый насос, который аккумулирует ионы натрия в клетки из внутриканальцевого пространства (Pitts, 1964). Удельная активность Na, K-АТФазы в сосочковой зоне выше, чем в корковой, хотя основная масса натрия реабсорбируется в проксимальной части нефрона. Общий уровень транспортного фермента (без пересчета на мг белка) существенно выше именно в корковой зоне почек*. Вместе с тем, препараты Na, K-АТФазы, выделенные из проксимальных канальцев, содержат белок апикальных мембран, в которых отсутствует Na, K-АТФаза и площадь которых очень велика за счет щеточной каемки. Это обстоятельство может существенно снижать удельную активность фермента.

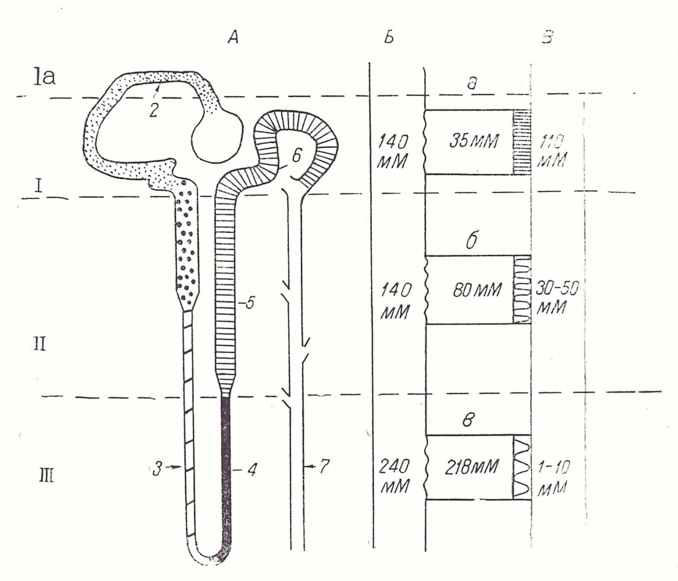



Рис. 1. Распределение ионов натрия (мМ) в клетках (*а, б, в*) корковой (*I*а, *I*), мозговой (*II*) и сосочковой (*III*) зон почки интактных крыс.

*А*—схема строения нефрона (Наточин, 1974): *1*—клубочек, *2*—проксимальный сегмент, *3*, *4*, *5*—нисходящее, восходящее, толстое, колена петли Генле соответственно, *6*—дистальный сегмент, *7*—собирательная трубочка; *Б*—интерстициальное пространство; *В*—просвет канальца.

Для выяснения особенностей работы натрий-калиевого насоса в каждой зоне почки мы исследовали влияние состава ионной

---

* В мозговой зоне расположены различные отделы нефрона, поэтому активность Na, K-АТФазы не может полностью отражать особенности транспорта ионов в толстых отделах петли Генле и дистальных канальцах.

среды и температуры инкубации на внутриклеточную концентрацию натрия и калия в срезах, приготовленных из корковой, мозговой и сосочковой зон.

При инкубации срезов почек при 18°С в бескалиевом растворе, содержащем 150 мМ натрия, или при охлаждении до 0°, т. е. в условиях, при которых сопряженный натрий-калиевый насос не функционирует, концентрация ионов натрия внутри клеток корковой зоны увеличивается, тогда как в клетках сосочковой зоны, наоборот, уменьшается.

Ниже представлены данные по распределению электролитов при различных состояниях ионных насосов почки.

| | *Внутриклеточная концентрация ионов, мМ ($M \pm m$) в различных зонах почки* | | |
|---|---|---|---|
| | *корковая* | *мозговая* | *сосочковая* |
| Натрий | | | |
| I | 35,8±0,91 | 80,0±2,10 | 218,0±6,91 |
| II | 88,0±2,86 | 89,1±1,92 | 95,8±2,12 |
| III | 73,4±2,83 | 84,3±3,05 | 163,8±4,01 |
| Калий | | | |
| I | 109,0±1,23 | 96,5±2,30 | 85,5±1,40 |
| II | 39,5±0,83 | 27,4±0,93 | 23,9±0,84 |
| III | 69,4±1,31 | 68,4±1,00 | 66,1±1,80 |

Примечание. Условия эксперимента: I—концентрация ионов в свежих срезах, II—через 30 мин выдерживания в среде без калия или при 0°С; III—последующая инкубация 30 мин в среде, содержащей 145 мМ натрия и 5 мМ калия, при 37°С.

Концентрация внутриклеточного калия снижается во всех зонах почки интактных крыс. При последующем перенесении срезов в среду, содержащую 150 мМ натрия и 5 мМ калия, и инкубации в течение 30 мин при 37° наблюдается некоторое снижение концентрации внутриклеточного натрия в корковой зоне, в то время как в клетках сосочковой зоны содержание натрия значительно возрастает. Содержание внутриклеточного калия повышается во всех зонах.

Описанные опыты показывают, что удаление калия из внешней среды, прекращение аэрации и охлаждение подавляют работу насоса, локализованного на базальной мембране клеток коркового слоя, что приводит к накоплению внутриклеточного натрия. Эксперименты свидетельствуют, что в эпителиальных клетках проксимальных канальцев, расположенных преимущественно в корковой зоне, функционирует «обычный» Na, K-насос, локализованный в базальных мембранах, характерный для многих эпителиальных тканей. В то же время ионный насос сосочковой зоны является «необычным», так как при его выключении содержание внутриклеточного натрия уменьшается, а при стимуляции — увеличивается. По-видимому, единственно удовлетворительным объясне-

нием этому может быть допущение, что в папиллярных клетках почечной ткани дополнительно к Na, К-АТФазе базальных мембран имеется натриевый насос, локализованный в апикальных мембранах, который, в противоположность всем известным насосам, аккумулирует натрий из мочи в клетку.

Таким образом, экспериментально подтверждено предположение о существовании активной аккумуляции натрия через апикальные мембраны сосочковой зоны. Следует признать несомненной биологическую целесообразность такого насоса, изымающего натрий из мочи на последнем этапе мочеобразования.

В связи с тем, что транспорт ионов вдоль нефрона на каждом его участке имеет свои особенности, а распределение ионов и активности АТФаз также неравномерно, возникла необходимость детального кинетического исследования свойств транспортного фермента из различно функционирующих сегментов нефрона. С этой целью изучены активность транспортного фермента в зависимости от рН и температуры среды преинкубации микросомальных препаратов, выделенных из корковой, мозговой и сосочковой зон почек интактных крыс.

Опыты показали, что оптимум рН для Na, К-АТФазы всех зон находится в области 7,5, а для Mg-АТФазы — 8,5. При исследовании температурной зависимости Na, К-АТФазы не обнаружено различий в свойствах ферментов, принадлежащих различным сегментам нефрона. Энергия активации, рассчитанная по формуле Аррениуса, составляла 9—12 ккал, что соответствует литературным данным для АТФазы других органов (Carrahan, Glynn, 1967). Оптимум температуры для транспортного фермента корковой, мозговой и сосочковой зон почки находится в области 50°С. Высокое значение температурного максимума свидетельствует о достаточной термостабильности Na, К-АТФазы. Для Mg-АТФазы оптимум температуры во всех исследованных зонах почки наблюдается в области 40°С, повышение температуры до 50°С быстро инактивирует этот фермент.

Варьируя рН и температуру, не удалось выявить различий в свойствах ферментов, локализованных в различных зонах почки. Тем не менее, при таком подходе обнаруживается связь между активностью и термостабильностью фермента корковой и сосочковой зон почки интактных крыс. Фермент корковой зоны более термостабилен и обладает меньшей удельной активностью, фермент сосочковой зоны, наоборот, характеризуется наибольшей скоростью гидролиза АТФ при тех же концентрациях активаторов и наименее термостабилен.

Зависимость активности фермента от концентрации субстрата мы изучали в 2 вариантах: на фоне 100 мМ $Na^{+}$+20 мМ $K^{+}$ и на фоне 30 мМ $Na^{+}$+3 мМ $K^{+}$. Установлено, что Na, К-АТФаза корковой зоны реагирует на изменение ионной силы среды инкубации иначе, чем мозговой и сосочковой. Графическое изображение скорости реакции по Лайнуиверу-Берку (рис. 2) также показы-

вает, что максимальная скорость ($V_{макс.}$) гидролиза АТФ низкая в корковой зоне, а в сосочковой — наиболее высокая. Низкое значение $K_m$, характерное для сосочковой зоны, может указывать на отличие в связывании субстрата и фермента в этой зоне. Однако различия в доступности субстрата нельзя объяснить только

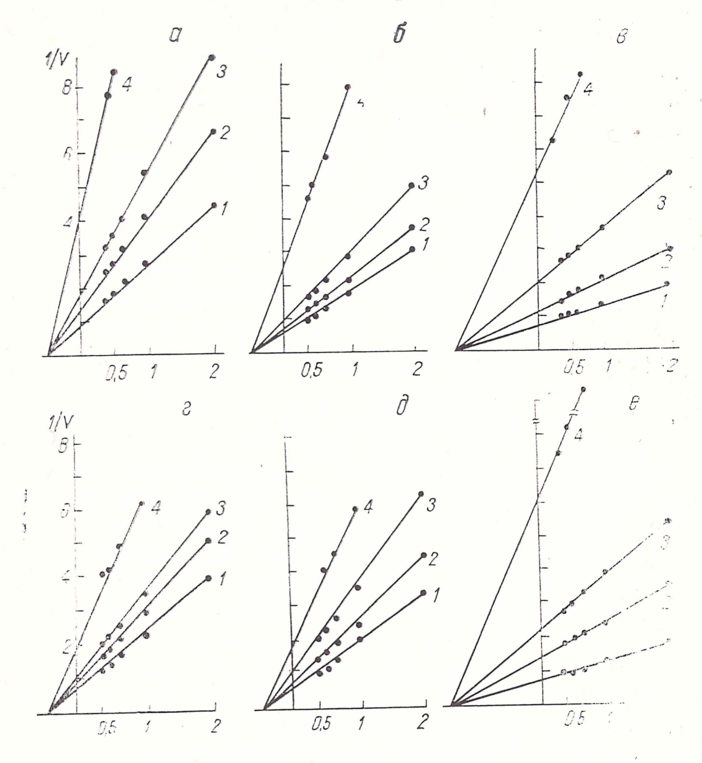



Рис. 2. График Лайнуивера—Берка для Na, K-АТФазы корковой (*а*, *г*), мозговой (*б*, *д*) и сосочковой (*в*, *е*) зон почек интактных крыс.

*а*, *б*, *в*—на фоне 100 мМ $Na^+$ +20 мМ $K^+$; *г*, *д*, *е*—на фоне 30 мМ $Na^+$ +3 мМ $K^+$; *V*—скорость гидролиза АТФ (мкМ $P_н$/мг белка/мин). *S*—концентрация субстрата (АТФ, мМ); *1*—без ингибитора; *2*, *3*, *4*—в присутствии 0,1, 0,5 и 1 мМ олиторизида соответственно.

разницей в плотности структуры мембран сосочковой, мозговой и корковой зон почки, так как ход реакции описывается уравнением Михаэлиса, несмотря на то, что субстрат и АТФаза локализованы в различных фазах*. Можно полагать, что процессы,

* При гетерогенном ферментативном катализе лимитирующей стадией обычно является стадия проникновения водорастворимого компонента реакции в гидрофобную зону и последующая активация фермента.

протекающие на границе раздела фаз, не являются лимитирующими, а определяются кинетикой связывания субстрата и фермента в этих зонах. Характерно, что в сосочковой зоне почки наблюдается большая доступность субстрата для связывания с ферментом, что косвенно указывает на различия в свойствах Na, K-АТФазной системы вдоль нефрона. Эти различия могут быть связаны с локализацией нескольких АТФазных систем в этой зоне.

Правомерность такого предположения подтверждается исследованием кинетики транспортного фермента при различных концентрациях субстрата (0,25—6,0 мМ АТФ) в присутствии переменных концентраций ингибитора Na, K-АТФазы — сердечного гликозида (олиторизид). Ингибирование фермента протекает по неконкурентному механизму, а характер торможения в сосочковой зоне резко отличается от характера ингибирования в корковой и мозговой зонах почки.

Представленные результаты показывают, что свойства АТФазных систем микросомальных фракций в исследованных зонах почки не идентичны. Остается открытым вопрос, насколько гидролиз АТФ в сосочковой зоне связан с существованием более чем одной АТФазной системы. Для доказательства этого предположения было предпринято изучение кинетики активации фермента в присутствии переменных концентраций АТФ и ингибитора на фоне различных концентраций одновалентных ионов.

Предварительные опыты, проведенные в среде инкубации, содержащей 100 мМ $Na^{+}$+20 мМ $K^{+}$ и 30 мМ $Na^{+}$+3 мМ $K^{+}$, также показали, что АТФазные системы корковой и сосочковой зон почки существенно различаются. Тем не менее, одного факта связывания субстрата с ферментом недостаточно для решения вопроса, происходит ли изменение связывания из-за различий в ферментных системах указанных зон или за счет разной скорости диффузии субстрата в пределах мембраны. Возможно, существуют отличия и в ферментных системах и в их микроокружении.

При использовании варьирующих количеств натрия и калия как активаторов удалось получить более определенные результаты. Было исследовано влияние различных концентраций натрия (от 4 до 200 мМ) на активность транспортного фермента в присутствии калия в какой-либо постоянной концентрации (1—80 мМ), и наоборот. Эксперименты показали, что в присутствии 1—3 мМ калия активность фермента резко возрастает при повышении концентрации натрия от 4 до 30 мМ. Более высокие концентрации натрия на фоне 1 мМ калия ингибируют АТФазу во всех зонах. По-видимому, это объясняется тем, что высокие концентрации натрия подавляют эффект калиевой активации. Характер ингибирования ионами натрия, однако, различается при изучении АТФазы корковой и сосочковой зоны. Во-первых, удельная активность транспортного фермента в сосочковой зоне намного выше, чем в корковой зоне, во-вторых,— Na, K-АТФазная

система в сосочковой зоне имеет 2 пика активации при 2 различных концентрациях ионов натрия и калия: для 1-го максимума с активностью 0,66 мкМ $Ф_н$/мг белка/мин при 3 мМ калия и 30 мМ натрия, для 2-го максимума с активностью 0,85 мкМ $Ф_н$/мг белка/мин при 20 мМ калия и 30 мМ натрия. Напротив, в корковой зоне наблюдается лишь 1 максимум активности, обычный для Na, K-АТФазных систем из других источников (Schwartz et al., 1975). Указанные максимумы выявляются и в мозговой зоне, однако там они менее выражены. По-видимому, это объясняется тем, что в мозговую зону входят одновременно различные участки нефрона.

Таким образом, при изучении кинетики активации Na, K-АТФазы различными концентрациями натрия на фоне возрастающих концентраций калия, т. е. при изучении ее чувствительности к калию выявлены 2 зоны связывания калия: 1-й пик в области 1—3 мМ $K^+$ и 2-й — при 20 мМ $K^+$. Эти пики наиболее четко проявляются в сосочковой зоне и менее выражены в мозговой; в корковой зоне они отсутствуют. При более высоких концентрациях натрия (120—200 мМ) пики, соответствующие 1—3 и 20 мМ калия, сливаются с образованием плато (рис. 3).

В настоящее время накопилось достаточное количество фактов о существовании 2 АТФазных систем в эпителиальных тканях. В экспериментах Kawado et al. (1969), Philippot et al. (1972) также выявлены 2 максимума активации Na, K-АТФазы у плеопод на фоне 30 и 100—120 мМ натрия, если в среде присутствуют 7,5—12,5 мМ калия; при других концентрациях калия (выше и ниже) обнаруживается только 1 пик активации. Эти данные, по мнению авторов, свидетельствуют о существовании 2 различных ферментов, требующих присутствия натрия и калия, и о принадлежности этих ферментов к 2 различным насосам, один из которых локализован на мукозной стороне мембраны, другой — на серозной. Следует отметить, что до настоящего времени не было данных об одновременном существовании 2 Na, K-АТФазных систем в сосочковой зоне почек.

Разный характер активации ионами натрия и калия транспортного фермента в исследованных зонах, очевидно, отражает неодинаковые свойства Na, K-АТФазных систем вдоль нефрона, а также может указывать на значительные различия в области ближайшего микроокружения фермента. В сосочковой зоне отмечается более высокая чувствительность к ионам, тогда как Na, K-АТФаза корковой зоны более резистентна к высоким концентрациям ионов.

Таким образом, исследование кинетических характеристик транспортного фермента из различно функционирующих зон почки крыс свидетельствует о его функциональной неоднородности вдоль нефрона. Поскольку транспортные функции, осуществляемые в каждом сегменте нефрона, различны, можно утверждать, что гетерогенность Na, K-АТФазных систем имеет физиологическую основу. Подтверждением такого вывода могут служить дан-

ные Whittembury (1960—1972) о существовании 2 натриевых насосов в базальных мембранах эпителиальных клеток почки и Наточина (1969—1976) о различных насосах на протяжении нефрона.

Выявление активации с различными оптимумами для ионов в исследованных нами зонах почки также позволяет заключить,

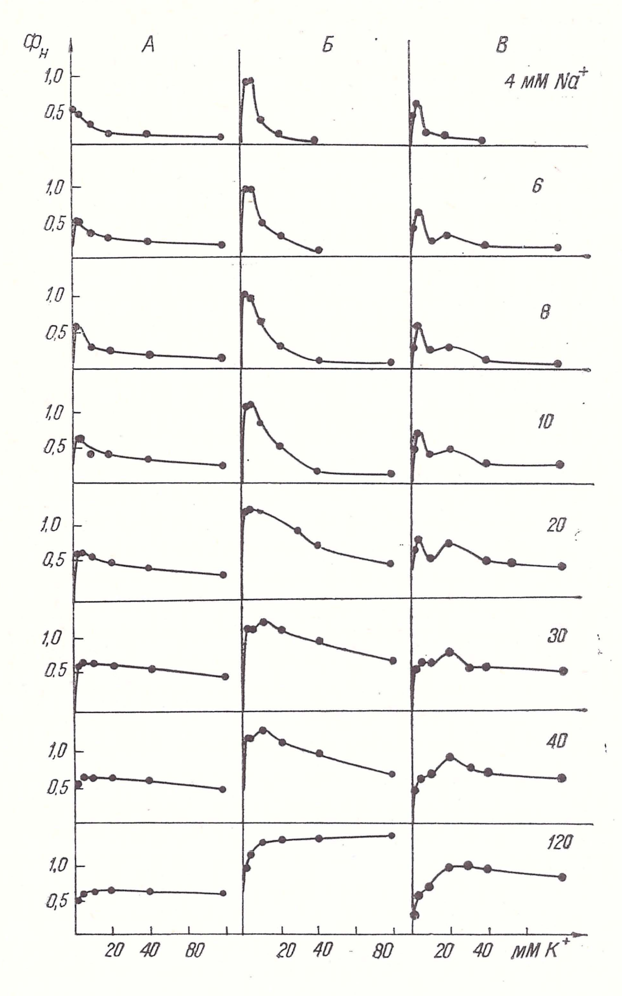



Рис. 3. Кинетика активации Na, K-АТФазы корковой (*А*), мозговой (*Б*) и сосочковой (*В*) зон почки ионами калия на фоне различных концентраций натрия.

что существуют 2 различные транспортные ферментные системы, активируемые натрием и калием. Обнаружение АТФаз с различными кинетическими характеристиками, видимо, имеет существен-

ное значение для объяснения молекулярных механизмов адаптации животных к различным водно-солевым режимам. Многие исследователи (Taylor et al., 1967; Jampol, Epstein, 1970; Zaugg, McLain, 1971; и др.) отмечают, что при росте, развитии и дифференцировке тканей свойства мембран изменяются в сторону увеличения транспортных функций.

На основании данных, представленных в этом разделе, можно сделать вывод, что специфика транспорта ионов в отдельных сегментах нефрона определяется наличием функциональной гетерогенности транспортных АТФаз, которая в значительной степени может зависеть от фосфолипидного состава АТФазного комплекса и других структурных компонентов мембран в сегментах нефрона и микроокружении АТФазных систем. Такое предположение вполне допустимо, так как хорошо известно, что замена некоторых фосфолипидов, прочно связанных в молекуле фермента, сопровождается существенным изменением АТФазной активности (Dahl, Hokin, 1974; Швец и др., 1974).

## ВЛИЯНИЕ ГОРМОНОВ НА ТРАНСПОРТ ИОНОВ И УРОВЕНЬ Na, K-АТФазы

Один из основных вопросов физиологии почки — выяснение механизмов действия минералкортикоидов на транспорт ионов в почках. При нарушении функции надпочечников происходят изменения важных процессов в организме, и, в первую очередь, реабсорбирующей способности почечных канальцев. После двусторонней адреналэктомии у крыс снижается фильтрация и реабсорбция натрия. При этом многие авторы отмечают падение активности Na, K-АТФазы в препаратах микросом почек (Chignel, Titus, 1966; Landon et al., 1966; Katz, Epstein, 1967; Jorgensen, 1972; Крестинская, Манусова, 1973). Альдостерон, введенный адреналэктомированным крысам в физиологических дозах, нормализует экскрецию натрия и одновременно несколько повышает активность микросомальной АТФазы, но не восстанавливает ее до исходных величин.

Для выяснения роли кортикостероидов в регуляции транспорта ионов мы исследовали активность Na, K-АТФазы, внутриклеточное распределение ионов натрия и калия, работу натрий-калиевого насоса, а также кинетику активации транспортного фермента через 7 дней после двусторонней адреналэктомии. Опыты показали, что при удалении надпочечников внутриклеточная концентрация натрия снижается во всех зонах: в коре незначительно, в мозговой зоне почти в 2 раза, а в сосочке — более чем в 4 раза. Одновременно в сыворотке крови понижается уровень натрия и увеличивается концентрация калия, в моче, наоборот, содержание натрия резко возрастает.

Для выявления эффективности работы натрий-калиевого насоса срезы различных зон почек интактных и адреналэктомиро-

ванных крыс выдерживали в течение 30 мин при 0°С и затем инкубировали их при 37°, после чего определяли внутриклеточную концентрацию ионов. Эти эксперименты показывают, что адреналэктомия вызывает нарушение работы натрий-калиевого насоса в почке. Наибольшие изменения проявляются в сосочковой зоне, где существенно снижается способность к аккумуляции натрия в клетки из внутриканальцевого пространства. Внутриклеточное пространство при этом заметно не меняется.

Падение уровня натрия в сосочковой зоне почек вследствие адреналэктомии было отмечено также в работах Kessler et al. (1964) и др. Однако данные литературы по вопросу о содержании ионов в зонах почки после адреналэктомии весьма противоречивы; Platts (1964), Mariani, Malvin (1965) не смогли обнаружить каких-либо изменений в электролитном составе клеток сосочковой зоны при адреналэктомии. Противоречивы также данные относительно изменения активности транспортного фермента при адреналэктомии (Ebel et al., 1971; Schwartz et al., 1975).

Наши опыты показали, что после удаления надпочечников уровень транспортного фермента и Mg-АТФазы в различных зонах почки снижается неодинаково. В корковой зоне уменьшается активность и Na, K-АТФазы и Mg-АТФазы, при этом их отношение не отличается от контрольных величин (0,42). В мозговой зоне падает активность также обеих АТФаз, однако уровень транспортного фермента снижается быстрее. В сосочковой зоне активность Mg-АТФазы не меняется, а транспортная АТФаза существенно ингибируется. Следовательно, при недостатке кортикостероидов преимущественно подавляется активность транспортного фермента в сосочковой зоне. Таким образом, при кортикостероидной недостаточности в сосочковой зоне одновременно уменьшается и активность транспортной АТФазы и уровень внутриклеточного натрия.

Очевидно, отмеченные нами изменения содержания натрия в различных отделах нефрона имеют разную природу. В начальных сегментах нефрона, где ионы натрия поступают из просвета канальца в клетки по концентрационному градиенту, адреналэктомия, по-видимому, уменьшает пассивный вход натрия. Вместе с тем, при адреналэктомии снижается уровень функционально активной Na, K-АТФазы и это в большой степени отражается на распределении ионов натрия в конечных сегментах нефрона, где имеется дополнительный Na-K-насос на апикальных мембранах.

Для выяснения молекулярных аспектов действия кортикостероидов, приводящего к нарушению натрийзадерживающей функции почек, необходимы более детальные сведения о свойствах Na, K-АТФаз каждой зоны при отсутствии или недостатке стероидных гормонов. С этой целью мы исследовали влияние температуры, различных концентраций субстрата, ингибиторов и активаторов на активность Na, K-АТФазы корковой, мозговой и сосочковой зон почек крыс через 7 дней после удаления обоих надпо-

чечников. В этих опытах существенных различий в энергии активации ферментов из разных зон почек интактных и адреналэктомированных крыс, также как и оптимумах pH, не обнаружено.

Чувствительность Na, K-АТФазы к субстрату и ингибитору микросомальных препаратов почек адреналэктомированных крыс определяли путем инкубации ферментативного препарата с различными концентрациями АТФ (0,5—3,0 мМ) и олиторизида ($10^{-8}$—$10^{-3}$ М) при постоянном уровне натрия и калия и постоянном отношении Mg/АТФ, равном единице. Анализ кинетики активации транспортной АТФазы показал, что после удаления надпочечников увеличение концентрации ингибитора оказывает более сильное торможение, чем в ферментативных препаратах, выделенных из интактных почек. Отчетливые сдвиги, характерные для сосочковой зоны, в корковой зоне не выражены. Более того, чувствительность АТФазы к олиторизиду повышается, следовательно, при патологии облегчается доступ ингибитора к участку связывания с ферментом. Это однозначно свидетельствует о «разрыхлении» АТФазной системы при адреналэктомии.

При изучении кинетики активации ионами Na, K-АТФазы почек адреналэктомированных крыс выявлены значительные изменения. Повышенные концентрации калия заметно угнетают активность транспортного фермента корковой зоны. В сосочковой зоне уменьшается пик активации, соответствующий 3 мМ калия, и исчезает 2-й пик активации по калию (рис. 4). При низких концентрациях натрия общий уровень активации снижается во всех зонах. Увеличивающиеся концентрации калия не ингибируют активность Na, K-АТФазы сосочковой зоны в отличие от ферментативного препарата, выделенного из почек интактных крыс. Все эти данные указывают на понижение чувствительности транспортного фермента к низким концентрациям моновалентных ионов.

Факты, полученные в экспериментах с адреналэктомией, еще раз подтверждают предположение о существовании в сосочковой зоне двух типов Na, K-АТФазных систем, различающихся по чувствительности к ионам. Активация ионами Na, K-АТФазы в разных зонах почки при удалении надпочечников происходит, по-видимому, неодинаково. Это косвенно может указывать на изменение соотношения транспортных систем при адреналэктомии.

Для выявления локализации действия гормонов на транспорт ионов вдоль нефрона адреналэктомированным крысам в течение 5—6 дней после операции вводили различные дозы альдостерона, дезоксикортикостерона (ДОКА) и гидрокортизона с последующим определением активности Na, K-АТФазы и распределения ионов натрия и калия по зонам почки. После инъекции ДОКА и альдостерона увеличивается активность транспортой АТФазы в мозговой и сосочковой зонах, одновременно повышается внутриклеточная концентрация натрия; в корковой зоне существенных сдвигов в активности фермента не наблюдается.

Инъекция гидрокортизона оказывает действие на активность ферментов корковой и мозговой зон (рис. 5). Одновременно нормализуется ионный состав клеток этих зон. Увеличение внутриклеточной концентрации натрия в корковой зоне при введении кор-

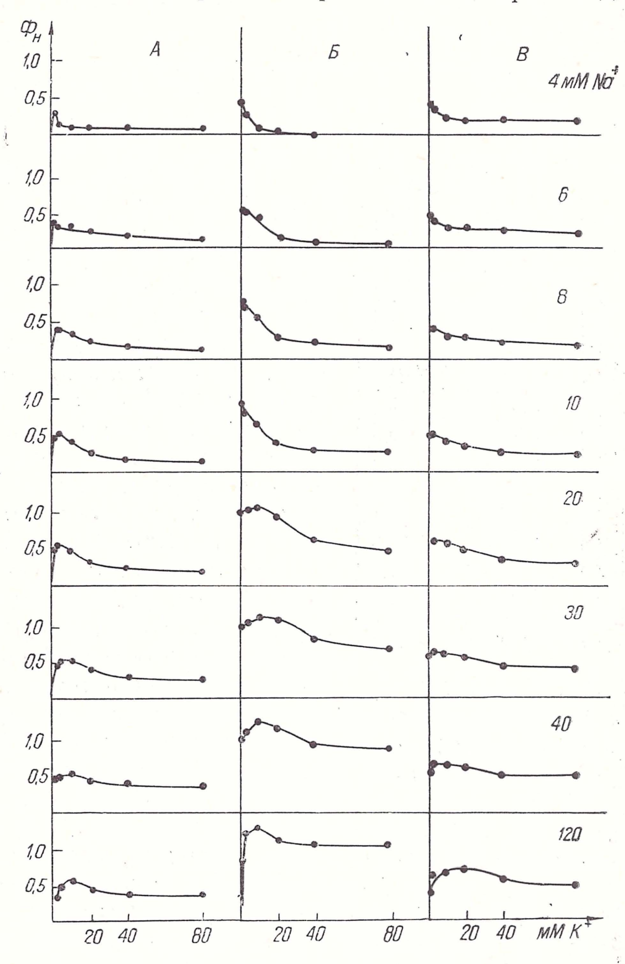



Рис. 4. Влияние адреналэктомии на кинетику активации Na, K-АТФазы корковой (*А*), мозговой (*Б*) и сосочковой (*В*) зон почки ионами калия на фоне различных концентраций натрия.

тикостероидов обусловлено повышением проницаемости апикальных мембран клеток проксимальных канальцев.

Адреналэктомия снижает уровень натрия в крови в результате его экскреции с мочой. При этом экскреция калия падает, а его уровень в крови повышается. После введения ДОКА и аль-

достерона адреналэктомированным крысам содержание натрия в сыворотке крови и его экскреция нормализуются. Гидрокортизон восстанавливает экскрецию калия, повышает уровень натрия в сыворотке и несколько снижает его содержание в моче. Как следует из приведенных данных, минералкортикоиды эффективно восстанавливают натриевый баланс в организме, нарушенный адреналэктомией, и оказывают регуляторное действие на транспортный фермент в дистальных канальцах и в сегментах нефрона, локализованных в сосочковой зоне.

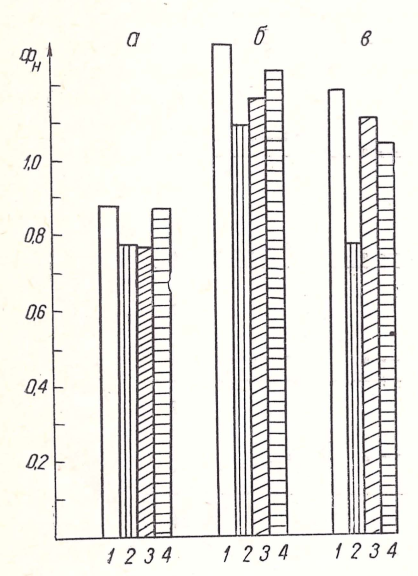



Рис. 5. Влияние гормонов на активность Na, K-АТФазы (мкМ$Ф_н$/мг белка/мин) корковой (*А*), мозговой (*Б*) и сосочковой (*В*) зон почки.

*1*—контроль; *2*—адреналэктомия; *3*—адреналэктомия+ДОКА; *4*—адреналэктомия+гидрокортизон.

Гидрокортизон, относящийся к глюкокортикоидам, обладает менее выраженным натрийзадерживающим эффектом по сравнению с минералкортикоидами, однако значительно влияет на активность АТФаз корковой зоны и на калиевый баланс. Возможно, увеличение активности Na, K-АТФазы корковой и мозговой зон почки после введения гидрокортизона адреналэктомированным крысам связано с усилением биосинтетических процессов (Lukasc et al., 1967; Grant, 1969).

Таким образом, как минералкортикоиды, так и глюкокортикоиды влияют на работу натрий-калиевого насоса в клетках нефрона. Эффект минералкортикоидов проявляется преимущественно на уровне дистальных канальцев, толстого и тонкого колен петли Генле и в собирательных трубочках, а гидрокортизон воздействует в основном на отделы нефрона, локализованные в корковой и мозговой зонах.

Нарушение натрий-задерживающей функции почек у адреналэктомированных крыс можно объяснить изменением свойств Na, K-АТФазного комплекса в сосочковой зоне. Вместе с тем, как отмечено выше, в сосочковой зоне изменяется соотношение 2 транспортных систем переноса ионов. Кинетический анализ показывает, что в результате адреналэктомии снижается чувствительность Na, K-АТФазы к ионам, поэтому в нисходящем и восходящем коленах петли Генле и в собирательных трубочках низкие концентрации ионов натрия перестают реабсорбироваться и натрий выводится из организма.

Для объяснения механизма действия кортикостероидов на активность Na, K-АТФазы почек дополнительно было исследовано

влияние гормонов in vitro. В опытах с определением АТФазной активности мембранной фракции почек не было выявлено влияние ДОКА, введенного in vitro в широком диапазоне концентраций ($10^{-6}$—$10^{-3}$ M). Гормон не действовал также на препараты АТФазы, выделенные из почек адреналэктомированных крыс. Инкубация ферментативного препарата Na, K-АТФазы из различных зон почки с другими гормонами — альдостероном, гидрокортизоном и питуитрином — также не изменяла активности Na, K-АТФазы. Для выявления возможного участия системы цАМФ в реализации гормональных эффектов на транспорт ионов препараты АТФазы одновременно были инкубированы с различными концентрациями гормонов и цАМФ. В этих условиях также не было обнаружено стимулирующего действия на АТФазу. Таким образом, активацию транспорта натрия нельзя объяснить непосредственным влиянием гормонов на транспортную АТФазу.

Две противоположные поверхности Na, K-АТФазы, анизотропно включенной в мембрану, также как и молекулярный механизм активного транспорта ионов в целом, обладают различным сродством к натрию и калию: увеличение содержания натрия и уменьшение калия внутри клетки активируют АТФазу, а вне клетки— тормозят ее активность (Glynn, 1962; Whittam, 1962; и др.). Мы предположили, что активация переноса ионов при действии минералкортикоидов объясняется изменением внутриклеточной концентрации ионов в результате изменения проницаемости апикальных мембран почечного эпителия и появления оптимальных ионных условий для активации транспортной АТФазы. Поэтому было предпринято исследование внутриклеточных концентраций ионов натрия и калия в срезах почки в норме и при действии гормонов.

При инкубации срезов почки в течение часа при 37°C в норме и при действии гормона (ДОКА) определено, что минералкортикоид вызывает заметное увеличение концентрации внутриклеточного натрия корковой зоны. Очевидно, в результате взаимодействия минералкортикоида с апикальной мембраной почечного эпителия происходит увеличение проницаемости для ионов, вследствие чего на этой мембране возрастают диффузионные потоки по градиентам концентраций. Именно этим можно объяснить увеличение концентрации натрия и уменьшение калия в клетках, выстилающих почечные канальцы, расположенные в корковой зоне.

Представленная схема гормональной регуляции активного транспорта натрия удовлетворительно объясняет механизм стимуляции реабсорбции натрия минералкортикоидами в эпителии почечных канальцев даже при одинаковом характере действия этих гормонов на обе (апикальную и базальную) мембраны клеток почечной ткани. В отличие от клеток дистального отдела, свободная поверхность эпителиальных клеток проксимального участка, обращенная в просвет канальца, покрыта щеточной каемкой, состоящей из микроворсинок, благодаря которым на апикальной по-

верхности общая площадь в несколько десятков раз превышает площадь базальной мембраны клеток. В силу разницы площадей увеличение внутриклеточной концентрации натрия почти полностью происходит за счет притока натрия из просвета проксимального канальца через апикальную мембрану.

Указанные изменения внутриклеточных концентраций ионов натрия и калия создают условия для стимуляции транспортной АТФазы, локализованной в базальных мембранах. Это вызывает активацию переноса натрия из клетки в окружающую среду против градиента концентрации. Описанная схема гормональной регуляции объясняет один из механизмов активации реабсорбции натрия минералкортикоидами в почечной ткани.

В основе активного трансцеллюлярного переноса ионов через клетки мочевого пузыря, кожи, слизистой кишечника и других эпителиальных тканей лягушки, также как и механизма Na, K-насоса вообще между клеткой и средой, лежит транспортная АТФ-аза, активируемая ионами натрия и калия и угнетаемая сердечными гликозидами. Поэтому описанная выше схема гормональной регуляции транспорта ионов применима и для других активно секретирующих эпителиальных тканей, в частности, для кожи и слизистой кишечника лягушки (Ташмухамедов, Далимова, Бекмухаметова, 1969; Ташмухамедов, Бекмухаметова, Ниязметова, 1970, 1971; и др.).

Основываясь на полученных данных, можно сделать вывод, что минералкортикоиды оказывают свое действие на транспорт ионов двумя различными путями. Один из путей регуляции начинается взаимодействием минералкортикоидов с апикальной мембраной эпителиальных клеток проксимальных канальцев и завершается стимуляцией анизотропной АТФазы, локализованной на базальной мембране. Другой путь регуляции связан со стимуляцией биосинтетических процессов в клетках, вследствие которой увеличивается синтез ферментов, в частности Na, K-АТФазы, участвующей в активном транспорте ионов. На это указывают значительный латентный период, необходимый для проявления эффектов минералкортикоидов, действие многих ингибиторов биосинтеза белка и нуклеиновых кислот на транспортные процессы (Edelman et al., 1972—1974; и др.) и представленные нами данные об отсутствии эффектов гормонов in vitro на активность Na, K-АТФазы.

ЛИТЕРАТУРА

Бекмухаметова З. У. 1975. Гормональная регуляция транспорта ионов. Ташкент.
Крестинская Т. В., Манусова Н. Б. 1973. Проблемы эндокринологии, **19**, 94.
Наточин Ю. В. 1969. «Журн. эвол. биох. и физиол.», **5**, № 2, 241.
Наточин Ю. В. 1976. Ион-регулирующая функция почки. Л.
Ташмухамедов Б. А., Далимова Д. С., Бекмухаметова З. У. 1969. «Биофизика», **14**, № 6, 1032.

Туракулов Я. Х., Бекмухаметова З. У., Ниязметова Н. 1971. ДАН УзССР, вып. 5, 48.
Швец В. И., Глебов Р. Н., Толстикова Г. В. 1974. ДАН СССР, 217, № 3, 733.
Bonting S. L. 1970. Membrane and Ion transport, 1, 257.
Burg M. B., Grantham J. J. 1971. Membrane and Ion transport, 3, 49.
Burg M. B., Orloff J. 1970. Am. J. Physiol., 219, № 6, 1714.
Chignell C. F., Titus E. O. 1966. J. Biol. Chem., 241, 5083.
Dahl J. L., Hokin L. E. 1974, Ann. Rev. Biochem., 43, 327.
Ebel H., De Santo N. G., Hierholzer K. 1971. Pflügers Arch., 324, 1.
Garrahan P. J., Glynn I. M. 1967. J. Physiol., 192, 217.
Glynn I. M. 1962. J. Physiol., 160, 18P.
Grant J. K. 1969. Essays Biochem., 5, 1.
Jampol L. M., Epstein F. H. 1970. Am. J. Physiol., 218, 607.
Jorgensen P. L. 1972. J. Steroid. Biochem., 3, 181.
Katz A. I., Epstein F. H. 1967. J. Clin. Invest., 46, 1999.
Kawado J., Taylor R. E., Barker S. B. 1969. Comp. Bioschem. Physiol., 30, 965.
Kessler E. et al. 1964. Am. J. Physiol., 207, № 1, 109.
Landon E. J., Jazab N., Forte L. 1966. Am. J. Physiol., 211, № 4, 1050.
Lukacs I., Sekeris C. E. 1967. Biochim. Biophys. Acta, 134, 85.
Mariani T., Malvin R. L. 1965. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 119, 881.
Nechay B. R. et al. 1971. Fed. Proc., 30, 332 A.
Philippot J., Thuet M., Thuet P. 1972. Comp. Biochem. Physiol., 41 B, 231.
Pitts R. F. 1964. Physiology of the Kidney and Body fluids. N. Y.
Schmidt U., Dubach U. C. 1969. Europ. J. Physiol., 306, 219.
Schwartz A., Lindenmayer G. E., Allen J. C. 1975. Pharmacol. Rev., 27, 3.
Skou J. C. 1957. Biochim. Biophys. Acta, 23, 392.
Skou J. C. 1962. Biochim. Biophys. Acta, 58, 314.
Taylor R. E., Kawado J., Barker S. B. 1967. Fed. Proc., 26, № 2, 659.
Torretti J. 1972. Am. J. Physiol., 222, № 6, 1398.
Whittam R. 1962. Biochem. J., 84, 160.
Whittembury J. 1960. J. Gen. Physiol., 48, № 5, 43.
Whittembury J., Proverbio F. 1970. Pflügers Arch., 316, 1.
Zaugg W. S., McZain L. R. 1971. Comp. Biochem. Physiol., 38 B, 501.

**М. В. ЗАМАРАЕВА, А. И. ГАГЕЛЬГАНС, Б. А. ТАШМУХАМЕДОВ**

# МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ПЕРЕНОСА $Ca^{2+}$ ЧЕРЕЗ МЕМБРАНУ САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА

Саркоплазматический ретикулум (СР) — сложная система цистерн и трубочек, выполняющая роль регулятора концентрации ионов $Ca^{2+}$ в мышечном волокне. СР принимает участие в сокращении мышечного волокна, высвобождая ионы $Ca^{2+}$ под действием электрического сигнала. Реаккумуляция ионов $Ca^{2+}$, вызывающая расслабление мышцы, происходит против электрохимического градиента за счет работы Са-АТФазы, утилизирующей энергию АТФ (Бендолл, 1970). В настоящее время этот процесс интенсивно изучается. При исследовании транспорта $Ca^{2+}$ через мембраны СР представляет интерес установить роль белок-липидных взаимодействий, влияние состояния липидной матрицы на

транспортные функции СР, а также возможные физиологические пути регуляции как поглощения $Ca^{2+}$ в СР, так и его высвобождения в среду. По-видимому, регуляция транспорта $Ca^{2+}$ возможна двумя путями. Первый путь — изменение сопряженности транспорта $Ca^{2+}$ и гидролиза АТФ за счет увеличения или уменьшения проницаемости мембран; второй путь — ингибирование или активация АТФазной активности.

Система транспорта $Ca^{2+}$ в СР чувствительна к изменению концентрации АТФ, ионов $Ca^{2+}$, $Mg^{2+}$, $Na^{+}$, $K^{+}$, к разобщающему действию жирных кислот и т. д. Обсуждается роль имидазолсодержащих дипептидов анзерина и карнозина, присутствующих в высоких концентрациях только в скелетных мышцах (Ритов, 1977). В литературе рассматривается роль циклической АМФ (цАМФ) в регуляции транспорта $Ca^{2+}$ в сердечной мышце (Tada et al., 1974), а также роль белковых активаторов Са-АТФазы, обнаруженных в гемолизате эритроцитов и супернатанте гомогената скелетной мышцы, так называемых «калмодулинов» (Philipson, Baumgartner, 1979). Предложенные механизмы выброса $Ca^{2+}$ вследствие увеличения проницаемости мембран СР под действием высоких концентраций наружного $Ca^{2+}$ (Katz et al., 1977), образования гидрофильного канала в результате агрегации молекул АТФазы (Jilka, Martonosi, 1977) и создания кратковременного диффузионного потенциала (Kasai, Miyamoto, 1973) пока не выдерживают критики. Таким образом, очевидно, что поиск регуляторных систем, управляющих движением $Ca^{2+}$ через мембрану СР, а также изучение транспорта $Ca^{2+}$ в СР при различных функциональных состояниях организма является актуальной проблемой.

## РОЛЬ БЕЛКОВ И ЛИПИДОВ В РЕГУЛЯЦИИ ПРОНИЦАЕМОСТИ МЕМБРАН САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА И РЕКОНСТРУКЦИЯ Са-НАСОСА

Известно, что саркоплазматический ретикулум обладает низкой проницаемостью для ионов $Ca^{2+}$ в покоящейся мышце. Механизм резкого увеличения проницаемости СР в процессе высвобождения $Ca^{2+}$ до настоящего времени неизвестен. В последние годы в литературе появляется информация о роли белков и липидов в регуляции Са-проницаемости. Скорость выхода $Ca^{2+}$ из липосом, приготовленных из общих фосфолипидов СР, составляет $1\cdot10^{-16}$—$1\cdot10^{-18}$ моль/см²/с (Vanderkooi, Martonosi, 1971; Martonosi et al., 1974). Эта скорость на несколько порядков меньше скорости пассивной утечки $Ca^{2+}$ в СР in vitro, которая лежит в области $1\cdot10^{-12}$—$1\cdot10^{-13}$ моль/см²/с (DeBoland et al., 1975).

Встраивание очищенной Са-АТФазы в липосомы, приготовленные из фосфолипидов СР, увеличивает пассивную проницаемость до величины, сравнимой с проницаемостью СР in vitro (Jilka et al., 1975, 1977). Следует отметить, что при этом увеличивается про-

ницаемость для $Na^+$, холина, $SO_4^{--}$, $Cl^-$, ацетата, сахарозы. Таким образом, встраивание Са-АТФазы нарушает плотную упаковку бислоя, создавая неспецифические гидрофильные поры или зоны утечки в местах контакта белка и липида. Интересным фактом является увеличение пассивной проницаемости СР при функционировании Са-АТФазы по мере накопления ионов $Ca^{2+}$. Этот вопрос подробно рассмотрен в работе Ритова (1977 б), где обсуждается явление обратного переноса $Ca^{2+}$ и (или) ослабление белок-липидных взаимодействий на одной из стадий гидролиза АТФ.

Проницаемость мембран СР, нагруженного $Ca^{2+}$ как в присутствии АТФ, так и простой диффузией, также очень низка. При создании градиента концентраций $Ca^{2+}$ на мембране СР хелатированием наружного $Ca^{2+}$ ЭГТА высвобождение внутреннего $Ca^{2+}$ происходит с незначительной скоростью. В этом случае проницаемость зависит от концентрации $Ca^{2+}$ внутри и снаружи везикул и от присутствия АТФ и $Mg^{2+}$. Изменение константы скорости для выхода $Ca^{2+}$ и обмена происходит приблизительно в пределах одного порядка (Weber, 1971a, Beirao et al., 1976).

Таким образом, создание концентрационного градиента на мембране СР не увеличивает существенно ее проницаемости. С другой стороны, добавление АДФ, ортофосфата и $Mg^{2+}$ к нагруженным везикулам резко увеличивает выход $Ca^{2+}$, сопровождающийся образованием АТФ. Это показывает, что потенциальная энергия трансмембранного градиента $Ca^{2+}$ может быть использована для фосфорилирования АДФ (Barlogie et al., 1971; Makinose, Hasselbach, 1971; Masuda, de Meis, 1974; Vale et al., 1976). Аналогичные результаты получены Racker и на реконструированных препаратах СР (Knowles, Racker, 1975). Высокая скорость синтеза АТФ свидетельствует о том, что значительное количество $Ca^{2+}$, высвобождаемого из СР, в этих условиях проходит через Са-насос (Panet, Selinger, 1972). Фосфорилирование Са-АТФазы происходит и в случае активного транспорта, и в случае выхода $Ca^{2+}$ в этих условиях (Makinose, 1972; Yamamoto, Tonomura, 1967; Yamada, Tonomura, 1973; de Meis, Carvalho, 1976).

Достаточный экспериментальный материал, обобщенный в обзоре Hasselbach (1978), свидетельствует, что высвобождение $Ca^{2+}$ в этих условиях связано с обращением Са-насоса. Однако число оборотов фермента в процессе аккумуляции (100 $c^{-1}$) намного больше, чем при обратном процессе (3 $c^{-1}$) при той же степени сопряжения Са/АТФ (Hasselbach, 1974). Маловероятно, чтобы такой механизм выхода $Ca^{2+}$ играл физиологическую роль в сопряжении возбуждения и сокращения, так как скорость выхода слишком мала, чтобы обеспечить достаточное количество $Ca^{2+}$ в миоплазме в течение короткого времени электромеханического сопряжения (Hasselbach, 1974).

Метод реконструкции транспортной функции протеолипосом, приготовленных из липидов и очищенной Са-АТФазы, позволил

сделать вывод, что основным, а возможно и единственным компонентом Са-насоса СР является Са-АТФаза. Низкая величина транспортного отношения $Ca^{2+}$/АТФ в реконструированных везикулах, полученных как без детергентов, так и с их использованием, характеризующая эффективность работы Са-насоса, не исключает существования какого-либо сопрягающего фактора, роль которого в опытах Racker была отведена протеолипиду (Racker, Eytan, 1975).

В работе Комарова (1978) предложен метод реконструкции транспортных свойств мембраносвязанной Са-АТФазы, практически лишенной протеолипида и других белковых загрязнений, с использованием длинноцепочечных углеводородов. Полученные протеолипосомы были способны активно накапливать $Ca^{2+}$. Таким образом, была подтверждена роль Са-АТФазы как единственного белкового компонента Са-насоса. Сопрягающая роль углеводорода объяснялась увеличением объема углеводородной фазы. Высокая проницаемость мембраносвязанных препаратов Са-АТФазы, по-видимому, действительно обусловлена дефицитом гидрофобного окружения, а не увеличением подвижности бислоя и ослаблением белок-липидных связей. На это, в частности, указывают опыты с применением диметилсульфоксида (ДМСО), способного сопрягать «разобщенный» ретикулум (рис. 1). ДМСО, однако, не был эффективен при попытке заменить им длинноцепочечный углеводород в процессе реконструкции. Его эффект на разобщенном ретикулуме, вероятно, обусловлен уменьшением текучести мембраны, так как ранее было показано, что он увеличивает температуру фазового перехода липидов мультислойных везикул (Liman et al., 1976).

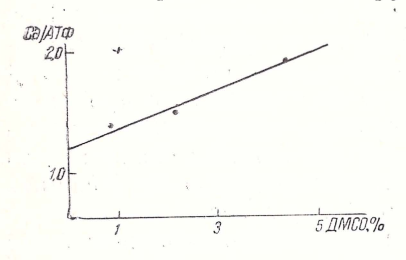



Рис. 1. Влияние ДМСО на величину Са/АТФ саркоплазматического ретикулума. СР выделяли по методу Ритова (1977а). Транспорт $Ca^{2+}$ и Са-АТФазную активность определяли методом рН-метрии. Среда инкубации: 2,5 мМ имидазол, рН 7,0, 100 мМ KCl, 4 мМ $MgCl_2$, 2 мМ АТФ, 5 мМ $K_2C_2O_4$. Объем пробы 4 мл. Пробы содержали 200—300 мкг белка СР. Реакцию начинали добавлением 200 нМолей $CaCl_2$.

Маловероятно, что эффект ДМСО связан с сорбцией или экстракцией жирных кислот, которые, как известно, накапливаются в препаратах СР при длительном хранении, и это накопление коррелирует со снижением величины Са/АТФ (Drabikowski, 1969). Добавление олеиновой кислоты к препаратам СР вызывает небольшое увеличение скорости выхода $Ca^{2+}$ из везикул, но резко снижает величину Са/АТФ (Козлов и др., 1973). При взаимодействии Са-АТФазы с АТФ увеличивается подвижность жирнокислотных цепей фосфолипидов, поэтому, возможно, внедрение олеиновой кислоты в зону гидрофобных контактов между белком и липидом способствует образованию дополнительных мест утечки $Ca^{2+}$ (Ритов, 1977б).

## ГЕТЕРОГЕННОСТЬ САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА И НЕКОТОРЫЕ ГИПОТЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ $Ca^{2+}$

Суммарная фракция СР гетерогенна по морфологическим характеристикам и, по-видимому, функциональным свойствам. Методом дифференциального центрифугирования в градиенте плотности сахарозы были получены 2 фракции СР — «легкая» и «тяжелая». «Легкая» фракция характеризуется высоким содержанием Са-АТФазы, отсутствием электронноплотного материала, «тяжелая» фракция — наличием электронноплотного материала и меньшим содержанием Са-АТФазы (Meissner, 1975).

Электронная микрофотография среза мышцы показала наличие электронноплотного материала только в терминальных цистернах. Это явилось основой предположения, что пузырьки, имеющие электронноплотный материал, представленный, по-видимому, кальсеквестрином и белком с молекулярным весом 55 тыс., образованы терминальными цистернами, в то время как «легкая» фракция образована из продолговатых трубочек ретикулума (Meissner, 1975). Методом авторадиографии установлено, что в состоянии покоя весь $Ca^{2+}$ находится в терминальных цистернах и что во время расслабления мышцы поглощение $Ca^{2+}$ идет через продолговатые трубочки, из которых $Ca^{2+}$ диффундирует затем в терминальные цистерны (Winegrad, 1970). Имеется также и биохимическая гетерогенность СР по чувствительности к кофеину. Так как ранее было показано, что кофеин инициирует мышечное сокращение одиночных и демембранированных волокон (Gebert, 1968; Lüttgan, Oetliker, 1968; Endo, Blinks, 1973; Huddart, Syson, 1975), то естественно было предположить, что его действие направлено на высвобождение $Ca^{2+}$ из терминальных цистерн, представленных «тяжелой» фракцией СР (Ogawa, 1970; Thorpe, 1973; Huddart, Williams, 1974).

Изучение эффекта кофеина на высвобождение $Ca^{2+}$ из тяжелой фракции СР, по мнению Алексеевой, Ритова (1979), может способствовать выяснению механизма выброса $Ca^{2+}$ в процессе возбуждения. Авторы на высокоочищенной «тяжелой» фракции СР показали, что кратковременная обработка трипсином и 5,5-дитиобиснитробензоатом (ДТНБ) полностью снимает эффект кофеина. Эти данные подтверждают взаимодействие кофеина с белковыми структурами, которое ранее было показано методом ЯМР (Konya et al., 1976).

Реконструкция транспортной функции у мембранного препарата кофеинчувствительной Са-АТФазы с сохранением эффекта кофеина предполагает, что этой белковой единицей является сама Са-АТФаза. Различное электрофоретическое поведение Са-АТФазы из «легкой» и «тяжелой» фракции СР при электрофорезе в дигитонине предполагает существование 2 изоформ фермента и подтверждает биохимическую гетерогенность СР (Алексеева, Ри-

тов, 1979). Гипотеза о существовании специфического белкового регулятора, расположенного на мембране Т-системы и обладающего кофеин-подобным действием при взаимодействии с терминальными цистернами в процессе возбуждения, интересна, однако низкая величина «разобщающего» эффекта кофеина вряд ли может обеспечить требуемую концентрацию $Ca^{2+}$ в саркоплазме за короткое время электромеханического сопряжения.

Из СР был выделен гликопротеид с молекулярным весом 30 тыс., который, по мнению авторов, расположен в зонах контакта между мембраной СР и Т-системой (Ikemoto et al., 1976), однако его физиологическая роль в настоящее время неизвестна. Нельзя исключить и существование других неидентифицированных до сих пор регуляторов, расположенных в зонах контакта. Представляется возможным существование какого-либо синергизма или дополнительного регуляторного механизма со стороны $Ca^{2+}$. Имеется определенная аналогия между кофеин-индуцируемым и $Ca^{2+}$-индуцируемым высвобождением $Ca^{2+}$ из СР (Inesi, Malan, 1976). Феномен высвобождения $Ca^{2+}$, индуцируемого внешним $Ca^{2+}$, изучен на демембранированных мышечных фибриллах, а также на препаратах СР, предварительно нагруженных $Ca^{2+}$ (Ford, Podolsky, 1975a, b; Endo, 1975; Inesi, Malan, 1976; Katz et al., 1977; Dunnett, Nayler, 1978).

Увеличение градиента концентраций $Ca^{2+}$ на мембране СР в 3 тыс. раз приводило к 1000-кратному повышению проницаемости по $Ca^{2+}$ (Katz et al., 1976, 1977). Однако скорость высвобождения $Ca^{2+}$ на 1 порядок ниже значения, вычисленного для скорости выхода $Ca^{2+}$ в нативной мышце (Katz et al., 1976). Концентрация внешнего $Ca^{2+}$ (0,5 мМ), необходимая для индукции выхода $Ca^{2+}$ из СР, на 2 порядка выше концентрации, необходимой для развития сокращения, поэтому вряд ли такой механизм имеет физиологическое значение (Endo, 1975). Нельзя исключить существование такого механизма в случае СР сердечной мышцы или при каких-либо других обстоятельствах, например в присутствии кофеина (Inesi, Malan, 1976). Аналогия между кофеин-индуцируемым и Са-индуцируемым высвобождением Са заключается в том, что в обоих случаях высвобождение $Ca^{2+}$ усиливается понижением уровня $Mg^{2+}$ и увеличивается при повышении концентрации $Ca^{2+}$. Кроме того, оба агента ($Ca^{2+}$ и кофеин) усиливают эффекты друг друга и оба эффекта ингибируются прокаином. Очевидно, что в физиологических условиях кофеин облегчает $Ca^{2+}$-индуцируемое высвобождение $Ca^{2+}$, которое в результате такого синергизма может происходить даже при низких концентрациях $Ca^{2+}$ (Inesi, Malan, 1976).

Связывание и высвобождение ионов $Ca^{2+}$ в СР, регулируемое изменением pH, изучено Nakamary et al. (1972). Процесс высвобождения $Ca^{2+}$ был показан как функция изменения pH. Резкое изменение pH от 6,46 до 7,8 вызывает выброс из СР аккумулированного $Ca^{2+}$. Уменьшение pH с 7,56 до 6,46 приводит к связы-

ванию $Ca^{2+}$. Эксперименты по преципитации актомиозина показали, что СР ингибирует этот процесс при pH 6,5 и не предотвращает его при pH 7,3. Считается, что ингибирующее влияние СР на преципитацию актомиозина обусловлено аккумуляцией $Ca^{2+}$ в СР. В более поздних работах на клетках сердца, лишенных сарколеммы, показано, что влияние pH реализуется путем изменения чувствительности миофибрилл к $Ca^{2+}$, а не выбросом $Ca^{2+}$ из сердечного ретикулума (Fabiato, Fabiato, 1976, 1979).

pH-зависимое изменение сродства к ионам $Ca^{2+}$ было продемонстрировано и для парвальбуминов (ПА), содержание которых в скелетных мышцах достигает 1 мМ (Бурштейн и др., 1977). Измерение изометрического напряжения глицеринизированных мышечных волокон в присутствии ПА показало возможность регулирования сокращения — расслабления изменением pH (Бурханов и др., 1978). Предполагается, что ПА могут играть роль pH-регулируемого депо $Ca^{2+}$. Однако остается неясным, могут ли такие изменения pH происходить в саркоплазме и какие биохимические механизмы вовлечены в этот процесс сдвига pH.

Кратковременная экспозиция СР при pH 5,5—6,0 вызывает инактивацию аккумуляции $Ca^{2+}$ без потери АТФазной активности и увеличения пассивной проницаемости (Bermann et al., 1977). Предполагается, что инактивация транспорта $Ca^{2+}$ в области pH 5,5—6,0 вызвана разобщением конформационного сопряжения между каталитической и ионофорной частями и что такой механизм может происходить при снижении pH до критического уровня во время тканевой аноксии или при других состояниях, в результате которых происходит необычайно быстрый гликогенолиз (Bermann et al., 1977).

Введение $Ca^{2+}$-нагруженных везикул СР, уравновешенных с калийметансульфонатом, в изоосмотический раствор KCl вызывает быстрое высвобождение ионов $Ca^{2+}$ (Kasai, Miyamoto, 1973; Miyamoto et al., 1979). Аналогичные эффекты наблюдались при исследовании развития напряжения мышцы на демембранизированных волокнах скелетной мышцы и механически разрушенных клетках сердца (Nakajima, Endo, 1973; Kerrick et al., 1974). Раньше этот эффект приписывали внутреннему отрицательному мембранному потенциалу, генерируемому быстрым входом $Cl^{-}$ в везикулы СР, в более поздних работах — осмотическим явлениям (Meissner, McKinley, 1976; Beeler, Martonosi, 1979). При помощи потенциалчувствительной краски (мероцианиноксазолон) показано, что изменения в абсорбции красителя одинаково индуцируются диффузионным потоком $Cl^{-1}$ внутрь везикул при замене пропионата калия на хлористый калий, увеличением концентрации наружного $Ca^{2+}$ или добавлением кофеина на демембранированных волокнах сердечной и скелетной мышц (Fabiato, Fabiato, 1977). В работе Russell et al. также было показано, что интерпретация результатов, полученных с помощью флуоресцентных зондов, чувствительных к потенциалу, несколько затруднена,

так как некоторые эффекты, полученные на нативных мембранах СР в присутствии лигандов ($Ca^{2+}$, АТФ и др.), наблюдаются и на солюбилизированном дезоксихолеатом натрия препарате СР (Russell et al., 1979 a, b). Эти эффекты, очевидно, обусловлены неспецифическим взаимодействием флуоресцентных потенциалзависимых зондов с поверхностным потенциалом мембран СР или с мембраносвязанным $Ca^{2+}$. В целом механизмы генерации потенциала, регистрируемого на мембране везикул СР в различных условиях, его природа и роль в регуляции цикла вход—выход $Ca^{2+}$ в настоящее время недостаточно ясны и требуют дальнейших исследований.

Поиск регуляторных механизмов проницаемости биологических мембран представляет интерес для понимания общего принципа функционирования биологических мембран, а также возможности их изменения при различных патологических состояниях.

В литературе высказывалось предположение, что уровень окисленности и восстановленности НАДН может регулировать проницаемость биологических мембран. Azzone et al. (1966) определили, что аминазин, действующий в митохондриях и микросомах на уровне флавиновых ферментов, эффективно тормозит аккумуляцию $Ca^{2+}$ в СР. Производные аминазина, а таже 2,6-дихлорфенолиндофенол (ДХФИФ), проявляющий электронно-акцепторное действие, ингибируют Mg, Ca-АТФазу эритроцитов (Wins, Schoffeniels, 1968) и снижают АТФ-зависимый выход $Ca^{2+}$ из «теней» эритроцитов (Ташмухамедов и др., 1969). Ингибирование аккумуляции $Ca^{2+}$ в СР ДХФИФ снимается добавлением НАДН (Azzone et al., 1966). Окисление эндогенного НАДН специфическими ферментными системами митохондрий приводит к увеличению выхода $Ca^{2+}$, а восстановление НАДН — к его реаккумуляции (Lehninger et al., 1978). Преинкубация микросом мозга с НАДН вызывает ингибирование Na, K-АТФазы (Кометиани, Шамкулашвили, 1969). Авторы предположили, что присутствие НАДН сдвигает окислительно-восстановительную цепь, существование которой в микросомах предполагалось ранее, в сторону восстановленности, и это приводит к изменению сродства фермента к ионам-активаторам. Таким образом, высказывается мысль об универсальной регуляции проницаемости биологических мембран редокс-состоянием пиридиннуклеотидов, которая может происходить при различных функциональных состояниях клетки. Изучение эффекта аминазина и ДХФИФ на транспорт $Ca^{2+}$ в СР методом pH-метрии позволяет разграничить влияние этих агентов на активность транспортного фермента и проницаемость мембран, а также проанализировать эти эффекты в связи с наличием флавопротеида в мембранах СР. ДХФИФ в концентрации $7{,}5\cdot10^{-4}$ М увеличивает проницаемость мембран СР для $Ca^{2+}$, снижает величину Ca/АТФ (рис. 2, цифры у кривых), характеризующую эффективность Ca-насоса, и не влияет на активность Ca-АТФазы. НАДН в концентрации $5\cdot10^{-3}$ М снимает этот эффект. Эти данные хорошо сог-

ласуются с результатами, полученными ранее Azzone, а также с наличием флавопротеида (ФП) в мембране СР, которое было продемонстрировано по способности СР восстанавливать ДХФИФ за счет добавленного извне НАДН (рис. 3).

В случае аминазина, известного в литературе не только в качестве локального анестетика и антиоксиданта, но и ингибитора ФП, уменьшаются Са-АТФазная активность и величина $Ca^{2+}$/АТФ в фрагментах СР (рис. 4). Следует отметить, что аминазин в тех же концентрациях ингибирует активность солюбилизированной, очищенной Са-АТФазы, не способной восстанавливать ДХФИФ (рис. 4). Очевидно, двойной эффект аминазина на функции СР

Рис. 2. Влияние ДХФИФ и НАДН на аккумуляцию $Ca^{2+}$ саркоплазматическим ретикулумом. Условия эксперимента те же, что указаны к рис. 1. Цифры у кривых—величина Са/АТФ.

*А*—контроль, *Б*—ДХФИФ $7{,}5\cdot10^{-4}$ М, *В*—НАДН $5\cdot10^{-3}$ М, *Г*—НАДН $5\cdot10^{-3}$ М, ДХФИФ $7{,}5\cdot10^{-4}$ М.

как дополнительный пример его множественного действия можно объяснить изменением проницаемости СР за счет регулирующего эффекта на уровне ФП, в то время как ингибирование Са-АТФазной активности связано с его непосредственным взаимодействием с ферментом за счет связывания с отрицательными группами Са-АТФазы или ее микроокружения.

Отдельные психотропные агенты, к которым относится и аминазин, действуют на целый ряд ферментов, функциональная активность которых регулируется белковыми регуляторами — «калмодулинами» (фосфодиэстераза, миозиновая АТФаза, Са-АТФаза), и не влияют на такие ферменты как Mg-АТФаза и протеинкиназа (Kobayashi et al., 1979). Предполагается, что агент, взаимодействуя с модуляторным белком, ингибирует активность Са-АТФазы и мешает образованию белок-белкового комплекса между ферментом и Са-модуляторным комплексом. 50% ингибирование Са-АТФазы СР достигается при концентрации аминазина $8{,}5\cdot10^{-5}$ М (рис. 4). Эта величина находится в области концентраций психотропных агентов, вызывающих 50% ингибирование ак-

тивации калмодулинами Са-АТФазы эритроцитов (Kobayashi et al., 1979). В настоящее время такой белок-активатор обнаружен в супернатанте гомогената скелетной мышцы (Philipson, Baumgartner, 1979), поэтому можно предположить, что действие аминазина опосредовано скорее через эндогенный белковый актива-

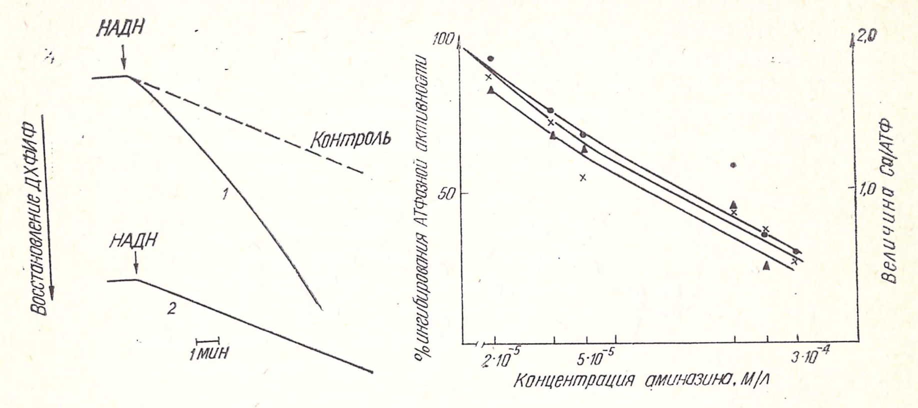



Рис. 3. Восстановление ДХФИФ НАДН в присутствии саркоплазматического ретикулума (*1*) и изолированной Са-АТФазы (*2*). Среда инкубации 2,5мМ имидазол, 4 мМ $MgCl_2$, 5 мМ $K_2C_2O_4$, ДХФИФ—$3 \cdot 10^{-4}$ М, pH 7,0; 230 мкг белка СР или Са-АТФазы. Реакцию восстановления ДХФИФ начиниали введением НАДН $5 \cdot 10^{-4}$ М. Кинетику изменения оптической плотности ДХФИФ регистрировали на фотометре ЛМФ-69 при длине волны—630 нм.

Рис. 4. Действие аминазина на транспортное отношение Са/АТФ, АТФазную активность изолированной Са-АТФазы и саркоплазматического ретикулума (кривые соответственно снизу вверх). Условия эксперимента те же, что указаны к рис. 1.

тор Са-АТФазы, чем на уровне флавопротеидов, наличие которых в мембране СР продемонстрировано косвенными методами (Azzone et al., 1966) (рис. 3).

## Са-АТФаза И ПРОБЛЕМА КАЛЬЦИЕВОГО «КАНАЛА» В МЕМБРАНЕ САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА

Экстракция мембран СР ЭДТА (Meissner, 1975) или низкими концентрациями детергента приводит к тому, что все белки, за исключением белка с м. в. 100 тыс., переходят в растворимую форму (Ритов, 1977 в). На этом основании его можно рассматривать как интегральный белок. Опыты по контролируемому триптическому перевариванию Са-АТФазы в мембранах СР также позволяют предположить, что часть белка проникает в гидрофобную область мембран, оставаясь недоступной для трипсина (Migala et al., 1973; Louis et al., 1974; Thorley-Lawson, Green, 1975; MacLennan, 1977).

Реконструкция транспортной функции у препаратов очищенной Са-АТФазы при слиянии с липидами свидетельствует, что Са-

АТФаза имеет как гидролитический, так и ионофоретический участок, прошивающий толщу мембраны и обеспечивающий перенос $Ca^{2+}$ на другую сторону мембраны. Встраивание неактивной, сукцинилированной, делипидированной Са-АТФазы, а также ее триптических фрагментов в черную плоскую мембрану вызывает резкое увеличение проводимости бислоев с относительным рядом селективности: $Ba^{++} >, Ca^{++} > Sr^{++} >, Mg^{++} >, Mn^{++} >, K^{+}, Cs^{+}, Li^{+}, Rb^{+}$ (Shamoo, MacLennan, 1974). Ингибирование проводимости по $Ca^{2+}$, индуцированное препаратом сукцинилированной Са-АТФазы, ионами $La^{3+}$, $Hg^{2+}$ и рутениевым красным в тех же концентрациях, что и ингибирование транспорта $Ca^{2+}$ в СР (рис. 5), позволяет

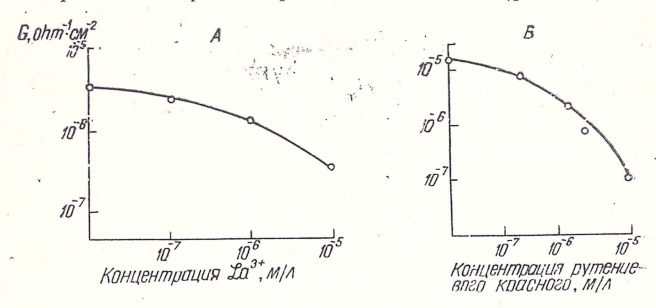



Рис. 5. Действие $La^{3+}$ (*А*) и рутениевого красного (*Б*) на кальциевую проводимость БФМ, индуцированную сукцинилированной Са-АТФазой. Модифицированную Са-АТФазу получали методом Shamoo, MacLennan (1974). Проводимость БФМ, полученных из раствора фосфолипидов, выделенных из белого вещества мозга и погруженных в раствор 5 мМ трис-HCl pH 7,0 и 30 мМ $CaCl_2$ в присутствии 0,6 мкг сукцинилированной Са-АТФазы, оценивали по падению напряжения, регистрируемого электрометром OP-205 (Венгрия).

предположить, что данная ионофорная активность наблюдается и при аккумуляции $Ca^{2+}$ в СР (Shamoo, MacLennan, 1975; Shamoo et al., 1975; Tashmukhamedov et al., 1975). Более весомые доказательства в пользу такого предположения в настоящее время отсутствуют. Неясным остается вопрос о молекулярном механизме индукции проводимости по $Ca^{2+}$. Встраивание Са-АТФазного липопротеидного комплекса в плоскую фосфолипидную мембрану сопряжено с некоторыми трудностями. Однако водорастворимая сукцинилированная Са-АТФаза, а также ее водорастворимые триптические фрагменты легко встраиваются в толщу гидрофобного бислоя мембраны, создавая проводимость.

Встраивание активной Са-АТФазы в липосомы увеличивает их пассивную проницаемость. В противоположность активному транспорту $Ca^{2+}$ и Са-АТФазной активности, такая пассивная проницаемость нечувствительна к изменению жирнокислотного состава липосом. Предполагается образование каналов в результате обратимой ассоциации нескольких АТФазных молекул в цилиндрические олигомеры, «пронизывающие» мембраны и создающие

гидрофильную область — пору (Jilka, Martonosi, 1977). АТФазные олигомеры стабилизированы белок-белковым взаимодействием, и если они составляют структурную основу Са-канала, то становится понятной нечувствительность проницаемости к изменению жирнокислотного состава.

Возможность существования Са-АТФазы в виде 2 форм — олигомерной и мономерной — и процесса агрегации — дезагрегации молекул АТФазы может иметь физиологическое значение в регуляции сродства фермента к субстрату, числа его «оборотов» или иметь отношение к высвобождению ионов $Ca^{2+}$ из цистерн СР в результате образования гидрофильных каналов. Основой для предположения о возможности существования Са-АТФазы в олигомерной форме послужили работы по образованию полимерных форм Са-АТФазы в присутствии бифункциональных «сшивающих» реагентов (Murphy, 1976; Louis et al., 1977; Chyn, Martonosi, 1977), а также электронномикроскопические данные замораживания—скалывания мембран СР (Malan et al., 1975; Jilka et al., 1975, Scales, Inesi, 1976).

Расчет количества полипептидных цепей на единицу площади мембран СР показал, что это значение превышает плотность 85 Å-частиц на поверхности скола мембраны (Malan et al., 1975). Плотность поверхностных частиц в 4,0 нм, выявляемых при негативном контрастировании, в 3—4 раза больше внутримембранных частиц, обнаруживаемых на поверхности скола (Jilka et al., 1975; Scales, Ines, 1976). Основываясь на этом, авторы предполагают, что гидрофобные части молекулы Са-АТФазы объединяются в тетрамеры, образуя частицы в 9,0 нм в то время как гидрофильные концы (4,0 нм-частицы) располагаются на наружной поверхности мембраны отдельно друг от друга. Исследование седиментации Са-АТФазы в неионном детергенте Твин-80 показало, что наименьшей активной формой солюбилизированного фермента Са-АТФазы является олигомер с м. в. 400 тыс. (Le Maire et al., 1976). Методом изоэлектрической фокусировки Са-АТФаза была разделена на 4 субъединицы с изоэлектрической точкой в области pH от 6 до 5. Индивидуальные пептиды имели м. в. 100 тыс. (Madeira, Madeira, 1977).

Использование различных бифункциональных реагентов, «сшивающих» молекулы белков на определенном расстоянии, и измерение при этом транспортных свойств СР, казалось бы, могло представить прямые доказательства возможности существования Са-канала. Однако плотность Са-АТФазных молекул в мембране СР столь высока, что образование полимерных форм, обнаруженное некоторыми авторами (Murphy, 1976; Louis et al., 1977; Chyh, Martonosi, 1977), может быть связано и со случайным столкновением молекул белка в результате теплового движения в плоскости мембраны. С другой стороны, применение агентов для химической «сшивки» приводит к неспецифической модификации Са-АТФазы в результате образования полимерной сетки в случае

использования глутаральдегида (Chyn, Martonosi, 1977), требует высоких значений pH при использовании имидатов (Louis et al., 1977), а также не исключает модификацию липидного окружения фермента при использовании фенантролина меди (Murphy, 1976).

Перечисленные выше моменты, несомненно, затрудняют объективную оценку функциональной роли образованных олигомеров и нативного характера этих образований. Понижение температуры до 4°C, приводящее к замедлению латеральной диффузии белковых молекул, выявляет образование в присутствии фенантролина меди только димеров даже при длительной экспозиции, в то время как при 22° происходит образование вначале димеров, а затем тримеров, тетрамеров и олигомеров (Baskin, Stephen, 1979). При —10° степень «сшивки» значительно меньше, и количество образованного олигомера тем меньше, чем больше его размеры. Авторы полагают, что образование олигомеров определяется не четвертичной структурой Са-АТФазы, а случайным столкновением молекул фермента (Hebdon et al, 1979). Вместе с тем, понижение температуры, в свою очередь, уменьшает проницаемость мембран, что может быть объяснено не только изменением физического состояния липидов, но и невозможностью образования олигомерных каналов в том случае, если этот процесс является обратимым.

Изучение переноса энергии между двумя популяциями АТФазных молекул, меченых донором (N-иодацетил-N-(5-сульфо-1-нафтил)-этилендиамин) и акцептором (йодацетамидофлуоресцин) энергии в реконструированных везикулах, показало, что увеличение липидной фазы, вызывающее снижение концентрации белковых молекул на единицу площади мембраны и таким образом уменьшающее вероятность столкновений в результате диффузии молекул в плоскости мембраны, не приводит к уменьшению интенсивности переноса (Vanderkooi et al., 1977). Эти данные говорят в пользу существования олигомерных комплексов Са-АТФазы. Более быстрое образование олигомеров при старении препаратов СР (Chyn, Martonosi, 1977), имеющих более высокую проницаемость, а также возможность полимеризации белков при появлении диальдегидов в результате индукции перекисного окисления липидов (ПОЛ) в мембранах СР, имеющих также высокую проницаемость (Каган и др., 1977), находится в определенном соответствии с представлением, что агрегация молекул АТФазы может быть связана с образованием гидрофильных каналов для $Ca^{2+}$.

## РОЛЬ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И ЛИПИДНОГО СОСТАВА МЕМБРАН В РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСПОРТА $Ca^{2+}$

Увеличение проницаемости мембран СР при индукции перекисного окисления липидов (ПОЛ) рассматривается также с точки зрения создания «перекисных кластеров» липидов. Перекиси липидов являются более полярными соединениями, чем неокис-

ленные липиды. В процессе латеральной диффузии может происходить объединение фосфолипидов, содержащих $HOO^-$-группировки, в гидрофильные каналы, проницаемые для ионов $Ca^{2+}$ (Каган и др., 1977). Ингибирование АТФазной активности при ПОЛ может быть связано с полимеризацией молекул АТФазы, а также с уменьшением содержания неокисленных полиеновых жирных кислот (Каган и др., 1977) или с появлением продуктов окисленной деструкции липидов мембран, так как промывка микросом раствором альбумина восстанавливает АТФазную активность (Player, Hultini, 1978).

В более поздних работах показано, что введение экзогенной гидроперекиси линолевой кислоты не влияет ни на какие параметры транспорта $Ca^{2+}$ вследствие низкого уровня включения ее во фрагменты СР, в то время как гидроперекись фосфотидилэтаноламина (ГПФЭА) оказывает слабое активирующее действие на активность Ca-АТФазы и увеличивает проницаемость везикул только при работе фермента (Каган и др., 1979). Предполагается, что в этом случае функционирование насоса обеспечивает высокую скорость обмена экзогенно введенной ГПФЭА между монослоями мембран СР и способствует образованию «перекисных каналов». Вместе с тем, при индукции ПОЛ как in vitro, так и in vivo (ишемия, Е-авитаминоз) эндогенная ГПФЭА образуется в обоих монослоях; высокая проницаемость СР в данном случае, по-видимому, связана с образованием гидроперекисями фосфолипидов «перекисных каналов» (Каган и др., 1979).

Регуляция проницаемости мембран, а также функциональной активности мембранных ферментов часто осуществляется на уровне липидов. У гибернирующих животных при переходе в состояние спячки повышается уровень ненасыщенных жирных кислот в мембране, что позволяет поддерживать «текучее» состояние мембраны, обеспечивающее ее нормальное функционирование при низких температурах тела (Hulbert, 1978). С другой стороны, довольно часто при различных миопатиях изменение проницаемости мембран СР и активности ферментов бывает связано с изменениями в липидной матрице. Изменение белок-липидного взаимодействия, коррелирующее с изменением функции мембран при различных патологических состояниях, представляет собой новую модель для изучения этих взаимодействий в мембране, недоступную при изучении in vitro. Так, установлено, что увеличение содержания холестерина в мембране СР при выраженном атеросклерозе вызывает изменение физико-химических свойств мембраны и понижение способности СР аккумулировать $Ca^{2+}$ (Стойда, Болдырев, 1978). У мышей с наследственной дистрофией увеличение количества фосфатидилэтаноламина и сфингомиелина наряду с резким снижением уровня фосфатидилхолина в мембране СР сопровождается изменением ацетилхолинэстеразной активности (Северина и др., 1974). При Е-авитаминозной мышечной дистрофии нарушается механизм активного транспорта $Ca^{2+}$ и увеличивается про-

ницаемость СР (Курский и др., 1978). Изменение жирнокислотного состава в сторону ненасыщенности при экспериментальной уремии приводит к увеличению проницаемости мембран СР (Heimberg et al., 1976). Увеличение или уменьшение активности Са-АТФазы СР скелетной (Fanburg, 1968; Ash et al., 1972) и сердечной мышцы (Suko, 1973; Limas, 1978), наблюдаемое соответственно при пониженном или повышенном уровне тиреоидных гормонов в организме, может быть обусловлено влиянием их на уровне биосинтеза белков, липидов и структурной организации мембран в целом.

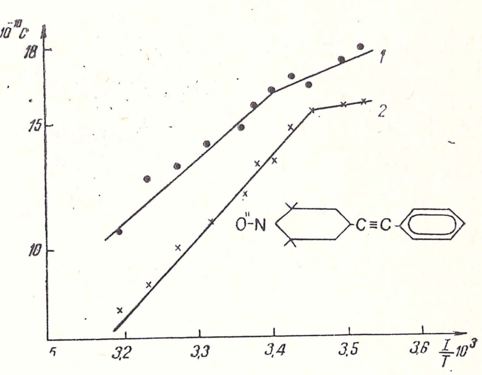



Рис. 6. Зависимость времени корреляции гидрофобного зонда, внедренного в СР, выделенного из белых мышц нормальных (*1*) и тиреотоксикозных (*2*) животных, от температуры. Спиртовый раствор гидрофобного зонда вводили в суспензию СР. ЭПР-спектры снимали на приборе Varian-4.

Достоверно определено, что активация кальциевого насоса при гипертиреоидизме сопровождается увеличением количества Са-АТФазы и предотвращается введением актиномицина D, циклогексимида и пуромицина. Незначительное увеличение пассивной проницаемости мембран для $Ca^{2+}$ объясняется увеличением фосфолипидного содержания, а также насыщенных жирных кислот (Limas, 1978). Введение животным больших доз тиреоидных гормонов приводит к резкому нарушению Са-транспортирующей функции СР, проявляющемуся в ингибировании Са-АТФазы в среднем на 30%, а также в снижении величины $Ca^{2+}$/АТФ, которая составляет $75 \pm 14$% от контроля. Так называемая «базальная», или Mg-АТФаза при этом изменяется незначительно. Эти эффекты могут быть обусловлены непосредственно «мембранным» воздействием тиреоидных гормонов, так как ранее в опытах in vitro было показано, что в присутствии высоких концентраций тиреоидных гормонов (50—100 мкМ) наблюдается уменьшение скорости транспорта $Ca^{2+}$ вследствие ингибирования Са-АТФазы (Замараева и др., 1979). Вместе с тем, они могут быть результатом нарушения белок-липидных взаимодействий, модификацией липидного и жирнокислотного состава и др.

В настоящее время в литературе обсуждается регулирующая роль тиреоидных гормонов в воздействии на клеточные мембраны посредством увеличения уровня ненасыщенности жирных кислот и вследствие этого модификации мембранной функции (Hoch, 1977; Hulbert, 1978). Исследование температуры фазового перехода мембран СР с помощью парамагнитных гидрофобных зон-

дов показало, что в случае препаратов, выделенных из мышц нормальных животных, фазовый переход наблюдается при 20°C, однако при тиреотоксикозе перегиб на графиках Аррениуса смещается на 4°C в область низких температур (рис. 6). Таким образом, тиреотоксикоз вызывает увеличенную подвижность, или «текучесть», липидного бислоя, которая определяется как физико-химическим состоянием липидного каркаса, так и белок-липидными взаимодействиями.

Результаты изучения жирнокислотного состава мембран СР из тиреотоксических животных показали снижение уровня ненасыщенности жирных кислот мембранных липидов за счет уменьшения олеиновой (на 21,8%) и арахидоновой (на 40,5%) кислот на фоне увеличения содержания пальмитиновой кислоты в 1,4 раза. Эти данные позволяют объяснить факт ингибирования Са-АТФазы, работа которой зависит от жесткости ее микроокружения (Warren et al., 1974). Снижение величины $Ca^{2+}$/АТФ при тиреотоксикозе может быть обусловлено увеличением проницаемости мембран СР для $Ca^{2+}$, например, за счет увеличения общего содержания липидов, холестерина или ослабления белок-липидных связей, в результате чего происходит «рециклизация» процесса аккумуляции $Ca^{2+}$ и наблюдается кажущееся уменьшение эффективности работы Са-насоса. С другой стороны, уменьшение величины $Ca^{2+}$/АТФ может происходить и в результате разобщения транспорта $Ca^{2+}$ и гидролиза АТФ, например, при денатурационных изменениях в ферменте.

## СПЕЦИАЛЬНЫЕ БЕЛКОВЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ КАЛЬЦИЕВОГО НАСОСА САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА

Как отмечалось выше, один из путей регуляции транспорта $Ca^{2+}$ в СР — специфическое ингибирование, или активация Са-АТФазной активности. Для ретикулума сердечной мышцы установлено, что транспорт $Ca^{2+}$ увеличивается при фосфорилировании белка с м. в. 22 тыс. (фосфоламбан) в присутствии циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) и цАМФ-зависимой протеинкиназы (Tada et al., 1974). Schwartz et al. (1976) установили цАМФ-зависимое фосфорилирование мембран сердечного ретикулума, опосредованное киназой фосфорилазы и увеличивающее аккумуляцию кальция. По-видимому, такой механизм регуляции транспорта $Ca^{2+}$ является специфичным для сердечной мышцы.

В настоящее время в литературе обсуждается существование низкомолекулярных белков (или белка), выделенных из мозга (Kobayashi, Field, 1978), семенников (Dedman et al., 1977), сердца (Авдонин, Ткачук, 1978), эритроцитов (Jarrett, Penniston, 1978), скелетных мышц (Philipson, Baumgartner, 1979) и регулирующих активность целого ряда ферментов в присутствии ионов кальция: фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов, аденилатцикла-

зы, Ca, Mg-АТФазы. Их регулирующее действие осуществляется только на таких ферментных системах, активность которых зависит от присутствия ионов $Ca^{2+}$, и таким образом белки-модуляторы обладают определенной специфичностью, не проявляя своего действия на Mg-АТФазу, Na, K-АТФазу, протеинкиназу (Gopinath, Vincenzi, 1977; Jarrett, Penniston, 1978; Kobayashi et al., 1979).

Активация ферментов происходит при образовании комплекса между ферментом и белком-активатором в присутствии $Ca^{2+}$. В присутствии активатора фосфодиэстеразы из мозга и активатора из гемолизата эритроцитов резко меняется зависимость Ca, Mg-АТФазы теней эритроцитов от концентрации ионов $Ca^{2+}$ (Gopinath, Vincenzi, 1977), обеспечивая наличие только Ca-связывающих участков с высоким сродством ($K_{дис.} = 4{,}3 \cdot 10^{-6}$ M), в то время как при отсутствии активаторов имеются участки как с высоким ($K_{дис.} = 1{,}8 \cdot 10^{-6}$ M), так и с низким ($K_{дис.} = 1{,}7 \cdot 10^{-5}$ M) сродством к $Ca^{2+}$. Наличие участков с высоким сродством в нативных мембранах авторы объясняют присутствием эндогенного активатора (Gopinath, Vincenzi, 1977). Отделение активатора аденилатциклазы сердца от фермента также лишает ее чувствительности к $Ca^{2+}$ (Авдонин, Ткачук, 1978).

Интересным фактом является и возможность перекрестной активации, Так, определено, что Ca, Mg-АТФаза эритроцитов может активироваться модулятором из гемолизата эритроцитов, семенников крыс (Kobayashi et al., 1979), фосфдиэстеразным активатором из мозга, тропонином C, парвальбумином (Gopinath, Vincenzi, 1977), а также белком, выделенным из супернатанта гомогената скелетной мышцы (Philipson, Baumgartner, 1979). В свою очередь, Ca-АТФаза скелетной мышцы активируется модулятором из гемолизата эритроцитов (Philipson, Baumgartner, 1979). Фосфодиэстеразный активатор активирует аденилатциклазу (Gopinath, Vincenzi, 1977), в то время как активатор из гемолизата эритроцитов стимулирует фосфодиэстеразу циклических нуклеотидов (Jarrett, Penniston, 1977). Модуляторные белки из мозга и семенников могут отчасти заменить тропонин C в регуляции актомиозиновой АТФазы (Jarrett, Penniston, 1978).

Известная универсальность белков-активаторов, а также близкие физико-химические свойства многих из этих белков (модулятор из мозга, семенников, активатор из гемолизата эритроцитов), такие как одинаковые спектры поглощения, изоэлектрические точки, молекулярный вес, близкий аминокислотный состав, включая присутствие редкой аминокислоты триметиллизина, позволяют предполагать, что они являются функциональными эквивалентами (Jarrett, Penniston, 1978). Вместе с тем, в гемолизате эритроцитов свиньи наряду с активатором найден также термолабильный ингибитор Ca-АТФазы, подавляющий также активность фосфодиэстеразы и аденилатциклазы (Au, 1978). Таким образом, предполагается существование регуляторов: активаторов и ингибиторов целого ряда ферментов, однако остаются неясными

пусковые механизмы такой регуляции. Наличие модулятора в скелетной мышце предполагает, что если активатор является Са-связывающим белком, то увеличение уровня $Ca^{2+}$ в миоплазме в процессе сокращения переводит его в активное состояние, в результате проявляется его стимулирующий эффект на Са-АТФазу СР (Philipson, Baumgartner, 1979).

## ЛИТЕРАТУРА


Авдонин П. Б., Ткачук В. А. 1978, ДАН СССР, **238**, 726—729.

Алексеева О .М., Ритов В. Б. 1979. Биохимия, **44**, 1582—1593.

Бендолл Дж. 1970. Мышцы, молекулы и движение. М.

Бурштейн Э. А., Бурханов С. А., Пермяков Е. А. 1977. «Биофизика», 22, 946—948.

Бурханов С. А и др. 1978. Биофизика, **23**, 734—735.

Гольбер Л. М., Кандрор В. И. 1972. Тиреотоксическое сердце. М.

Замараева М. В., Гагельганс А. И., Ташмухамедов Б. А. 1979. «Воп. мед химии», № 1, 78—82.

Каган В. Е. и др. 1977. Биофизика, **22**, 625—630.

Каган В. Е. и др. 1979. «Бюлл. эксп. биол. и мед.», **87**, 145—149.

Козлов Ю. П., Ритов В. Б., Каган В. Е. 1973. ДАН СССР , **212**, 1239—1242.

Комаров П. Г. 1978. Роль гидрофобных белок-липидных взаимодействий в регуляции транспорта ионов $Ca^{2+}$ через мембрану саркоплазматического ретикулума. Автореф. канд. дисс. М.

Кометиани З. П., Шамкулашвили Г. Т. 1969. «Биофизика», **14**, 846—851.

Курский М. Д. и др. 1978. «Укр. биохим. журн.», **50**, 85—90.

Ритов В. Б. 1977а. Молекулярная организация и механизм функционирования Са-зависимой АТФазы саркоплазматического ретукулума. «Итоги науки и техники», Биологическая химия, т. 11. М., 5—77.

Ритов В. Б. 1977б. Биохимия человека и животных, № 1, 53—83.

Ритов В. Б. и др. 1977в. ДАН СССР, **233**, 730—733.

Северина В. А., Хайтина С. З., Добрынина О. В. 1974. «Вопр. мед. хим.», **XX**, 309—313.

Стойда Л. В., Болдырев А. А. 1978. «Бюлл. эксп. биол. и мед.», **86**, 32—35.

Ташмухамедов Б. А., Мирсалихова Н. М., Замараева М. В. 1969. Материалы симпозиума «Биофизика мембран», 14—21 июня. Паланга, 262—263.

Ash A. S. F., Besch H. B., Harigava S., Zaimis E. 1972. J. Physiol., 224, 1—19.

Au K. S., 1978, Int. J. Biochem. 2, 477—480.

Azzone G. F., Azzi A., Rossi C., Milic G. 1966. Biochem., **5**, 322—328.

Barlogie B., Hasselbach W., Makinose M. 1971. FEBS Lett., **12**, 267—268.

Baskin R. J., Stephen H. 1979. Biochim. Biophys. acta, **576**, 61—70.

Beeler T., Martonosi A. 1979, FEBS Lett., **98**, 173—176.

Beirao P., DeMeis L. 1976. Biochim. Biophys. acta, **433**, 520—530.

Berman M. C., McIntosh D. B., Kench J. F. 1977. J. Biol. Chem., **252**, 994—1000.

Chyn T., Martonosi A. 1977. Biochim. Biophys. acta, **468**, 114—126.

DeBoland A. R., Jilka R., Martonosi A. 1975. J. Biol. Chem. **250**, 7501—7510.

Dedman J. R., Potter J. D., Means A. R. 1977. J. Biol. Chem. **252**, 2437—2440.

Drabikowski W., Sarzala M. G., Grynblat A. G. 1969. Procceding of the Symp. on Biol. Membranes: «Biochemistry of intracellular structures: mitochondria and endoplasmic reticulum», Warsaw, December 10—11, 1968.

Dunnett J., Nayler W. 1978. J. Mol. and Cell. Cardiol., **10**, 487—498.
Endo M., Blinks J. R .1973. Nature New Biol., **246**, 218—221.
Endo M. 1975. Proc. Jap. Acad., **51**, 467—472.
Fabiato A., Fabiato F. 1976. Biophys. J., **16**, 72.
Fabiato A., Fabiato F. 1977. J. Gen. Physiol., **70**, A6.
Fabiato A., Fabiato F. 1979. Ann Rev. Phys., **41**, 473—484.
Fanburg B. J. 1968. J. Clin. Invest., **47**, 2499—2505.
Ford L. E., Podolsky P. J. 1972a. J. Physiol., **223**, 21—33.
Ford L. E., Podolsky R. J. 1972b. J. Physiol., **223**, 1—19.
Gebert G. 1968. Amer. J. Physiol., **215**, 296—298.
Gopinath R. M., Vincenzi F. F. 1977. Biochem. Biophys. Res. Comm., **77**, 1203—1209.
Hasselbach W. 1978. Biochim. Biophys. acta, **515**, 23—53.
Hasselbach W. 1974. 26. Int. Congr. Physiol. Sci. **10**, New Delhi, 182—183.
Hebdon M., Cunningham L., Green N. 1979. Biochem. J., **179**, 135—139.
Heimberg K. W. et al. 1976, Eur. J. Biochem., **61**, 207—213.
Hoch F., 1977. Arch. Biochem. Biophys., **178**, 535—545.
Hulbert A. J. 1978. J. Theor. Biol., **73**, 81—100.
Huddart H., Williams A. J. 1974. J. Comp. Physiol., B94, 331—338.
Huddart H., Syson A. 1975. J. Exp. Biol., **63**, 131—142.
Ikemoto N., Cucchiaro J., Garcia A. M. 1976. J. Cell. Biol. **70**, 290a.
Inesi G., Malan N. 1976. Life Sciences, **18**, 773—780.
Jarrett H. W., Penniston J. T. 1977. Biochem. Biophys. Res. Comm., **77**, 1210—1216.
Jarrett H. W., Penniston J. T. 1978. J. Biol. Chem., **253**, 4676—4682.
Jilka R., Martonosi A., Tillack T. 1975. J. Biol. Chem., **250**, 7511—7524.
Jilka R., Martonosi A. 1977. Biochim. Biophys. acta, **466**, 57—67.
Kasai M., Miyamoto H. 1973. FEBS Lett., **34**, 299—301.
Katz A. M. et al. 1976. FEBS Lett., **67**, 207—208.
Katz A. M. et al. 1977. «Myocardial Failure», Berlin ea, 72—79.
Kerrick W., Gleen L., Best Ph. 1974. Science, **183**, 435—437.
Knowles A. F., Racker E. 1975. J. Biol. Chem., **250**, 1949—1951.
Kobayashi R., Field J. B. 1978. Biochim. Biophys. acta, **539**, 411—419.
Kobayashi R., Tawata M., Hidaka H. 1979. Biochem. Biophys. Res. Comm., **88**, 1037—1045.
Kónya L., Köver J. I., Szilagui L. 1976. Stud. Biophys., **56**, 39—40.
Lehninger A. L., Vercesi A., Bababunmi E. A. 1978. Proc. Nat. Acad. Sci. **79**, 1690—1694.
Limas C. J. 1978. Amer. J. Physiol., **235**. H745—H752.
Louis C. F., Buonaffina R., Binks B., 1974. Arch. Biochem. Biophys., **161**, 83—92.
Louis C. F., Saunderss M. J., Holroyd J. A. 1977 Biochim. Biophys. acta, **493**, 78—92.
Lüttgau H. C., Oetliker H. 1968. J. Physiol., **194**, 50—74.
Lyman G. H., Papahadjopoulos D., Preisler H. D. 1976. Biochim. Biophys. acta, **448**, 460—473.
MacLennan D. H. 1977. J. Gen. Physiol., 70, A22.
Madeira V. M. C., Madeira M. C. Experientia, 33, 188—190.
Le Maire M., Moller J. V., Tanford C. 1976. Biochemistry, **15**, 2336—2342.
Malan N. J., Sabbadini R., Scales D., Inesi G. 1975. FEBS Lett., **60**, 122—125.
Makinose M., Hasselbach W. 1971. PEBS Lett., **12**, 271—272.
Makinose M. 1972. FEBS Lett., **25**, 113—115.
Martonosi A., Jilka R., Tortier F. 1974. In: «Membrane proteins Transp. and Phosphoryl», Amsterdam, c. a., 113—124.
Masuda H., FeMeis L. 1974. Biochim. Biophys. acta, **332**, 313—315.
DeMeis L., Carvalho M. G. C. 1976. J. Biol. Chem., **251**, 1413—1417.
Meissner G. 1975. Biochim. Biophys. acta, **389**, 51—68.
Meissner G., McKinley D. 1976. J. Membran. Biol., **30**, 79—98.

Migala A., Agostini B., Hasselbach W. 1973. Z. Naturforsch., **28c**, 178—182.
Miyamoto H., Kometani T. Kasai M. 1979. «Сейбуцу буцури» N 1, 1—10.
Murphy A. J. 1976. Biochem. Biophys. Res. Comm., **70**, 160—166.
Nakajima Y., Endo M. 1973. Nature New Biol., **246**, 216—218.
Nakamary Y., Schwartz A. 1972. J. Gen. Physiol., **59**, 22—32.
Ogawa Y., 1970. J. Biochem., **67**, 667—683.
Panet R., Selinger Z. 1972. Biochim. Biophys. acta, **255**, 34—42.
Philipson K. D., Baumgartner F. 1979. Biochim. Biophys. alta, **567**, 523—528.
Player T. J., Hultini H. O. 1978. Biochem. J., **174**, 17—22.
Racker E., Eytan E., 1975. J. Biol. Chem., **250**, 7533—7534.
Rusell J., Beeler T., Martonosi A. 1979a. J. Biol. Chem., **254**, 2040—2046.
Rusell J., Beeler T., Martonosi A. 1979b. J. Biol. Chem., **254**, 2047—2052.
Scales D., Inesi G. 1976. Biophys J., **16**, 735—751.
Schwartz A. et al. 1976. Biochim. Biophys. acta, **426**. 57—72.
Shamoo A. E. MacLennan D. H. 1974. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **71**, 3522—3526.
Shamoo A. E., MacLennan D. H. 1975. J. Memb. Biol., **25**, 65—74.
Shamoo A. E. et al. 1975. J. Biol. Chem., **250**, 8289—8291.
Suko J. 1973. J. Physiol., **228**, 563—582.
Tada M. et al. 1974. J. Biol. Chem., **249**, 6174—6180.
Tashmukhamedov B. A. et al. 1975. Abstr., V Inter. Biophys. Congr. Copenhagen, Denmark. 174.
Thorley-Lawson D. A., Green N. M. 1975. Eur. J. Biochem., **59**, 193—200.
Thorpe W. R. 1973. Can. J. Physiol. and Pharm., **51**, 499—502.
Vale M. G. P. et al. 1976. Biochem J., **156**, 239—244.
Vanderkooi J. M., Martonosi A. 1971. Arch. Biochim. Biophys., **147**, 632—646.
Vanderkooi J. M. et al. 1977. Biochemistry, **16**, 1262—1267.
Warren G. B. et al. 1974. J. Biochemistry., *13*, 5501—5507.
Weber A. 1971b. J. Gener. Physiol., **57**, 64—70.
Weber A. 1971a. J. Gen. Physiol., **57**, 50—63.
Winegrad. 1970. J. Gen. Physiol., **55**, 77—80.
Wins P., Schoffeniels F. 1968. Life Science, 7, 673—681.
Yamada S., Tonomura Y., 1973. J. Biochem., **74**, 1091—1096.
Yamamoto T., Tonomura Y. 1967. J. Biochem., **62**, 558—575.

**Т. Ф. ЮРАСОВА, З. У. БЕКМУХАМЕТОВА, Э. ТАШПУЛАТОВ**

## СВОЙСТВА ТРАНСПОРТНОЙ Na, K-АТФазы ПОЧЕК РАЗЛИЧНЫХ ЖИВОТНЫХ

Наличие ионного гомеостаза — одно из наиболее важных условий существования живого организма при взаимодействии с внешней средой. Реализация ионного гомеостаза как на уровне отдельных клеток, так и на уровне целого организма происходит при участии ионных насосов. Na-насос является молекулярной машиной, превращающей химическую энергию в электроосмотическую работу. Активный противоградиентный транспорт ионов натрия и калия через плазматические мембраны осуществляется натриевым насосом за счет сопряжения ионообменных процессов с ферментативным гидролизом АТФ. Na, K-АТФаза — фермент, которому в настоящее время придают ведущее значение в трансмембранном переносе натрия.

В последнее время появились обзоры, в которых достаточно полно изложены свойства натриевого насоса (Бекмухаметова, 1975; Лишко, 1977; Болдырев, Твердислов, 1978; Веренинов, 1978). Свойства Mg-зависимой, Na, K-активируемой АТФазы во многом совпадают со свойствами системы активного транспорта натрия: обе системы локализованы в мембране, ингибируются сердечными гликозидами, обладают сходным сродством к ионам-активаторам (причем ионы натрия активируют изнутри клетки, а ионы калия— снаружи), требуют присутствия макроэрга АТФ и т. д.

Впервые АТФаза, активируемая ионами натрия и калия, была выделена Skou в 1957 г. из нервной ткани краба. Описаны ее свойства. Впоследствии Na, K-АТФаза была обнаружена в мембранных препаратах, выделенных из многих органов и тканей животного и растительного происхождения.

Непременным условием причастности Na, K-АТФазы к активному транспорту ионов является корреляция между активностью фермента и скоростью переноса ионов в ткани, т. е. чем интенсивнее выкачивание ионов натрия из клетки, тем больше должно быть в клеточной мембране центров Na, K-АТФазы. Этот вывод подтвердили Bonting et al. (1961, 1963) после сравнительного анализа различных органов или тканей у одного или разных видов животных. Наибольшая активность Na, K-АТФазы отмечена в нервной ткани и ткани, имеющей секреторную функцию.

Наряду с регуляцией ионного баланса на уровне отдельных клеток транспорт ионов и водно-солевая регуляция в пределах целого организма у позвоночных осуществляется почками. В регуляции ионного гомеостаза могут также принимать участие кишечник, мочевой пузырь, кожа, жабры рыб, солевые железы птиц и т. д. Почечная ткань заслуживает особого внимания в связи с исключительно высокой интенсивностью процессов активного транспорта, так как трансцеллюлярный перенос ионов в клетках почечного эпителия является основной функцией почки. Ввиду неодинаковой функциональной роли разных участков нефрона в процессах реабсорбции ионов можно ожидать разной активности Na, K-АТФазы. Доказана более высокая активность фермента в красной медулле почек по сравнению с корой и папиллой (Martinez-Maldonado et al., 1969; Gutman et al., 1973; Юрасова, 1973), что объясняется важной ролью этого фермента в транспорте ионов натрия клетками восходящих отделов петли Генле при осмотическом концентрировании мочи.

Транспортная Na, K-активируемая АТФаза почек участвует в адаптации организма к различным факторам внешней среды (температурный, водный, пищевой и др.), следовательно, распределение активности этой ферментной системы вдоль нефрона у разных видов животных зависит от функциональной активности транспортных процессов в почке. Мы изучали распределение активности транспортной АТФазы в почках разных видов животных, обитающих в различных условиях и имеющих неодинаковое строе-

ние нефрона. Кроме того, был проведен кинетический анализ свойств микросомальной Na, K-АТФазы коры, медуллы и папиллы почек кроликов.

Объектом исследования служили самцы белых беспородных крыс и кроликов, желтые суслики, лягушки, черепахи. После забоя животных почки погружали в ледяной раствор, содержащий 0,25 *M* сахарозы, 0,05 *M* этилендиаминтетраацетата (ЭДТА), 0,10% дезоксихолата натрия (ДОХ), 0,03 *M* трис-HCl буфера, pH 7,6. После удаления капсулы из почек крыс, кроликов и сусликов визуально выделяли 3 зоны: поверхностную (корковую), красную мозговую (медуллу) и бледный сосочек (папиллу). Почки лягушек и черепах использовали целиком. Одинаковые навески ткани гомогенизировали на холоду и центрифугировали при 10000 $\times g$ в течение 30 мин. Надосадочную жидкость вновь центрифугировали при 30000$\times g$ в течение часа. Осадок ресуспендировали в среде, отличающейся от первой отсутствием ДОХ и меньшей концентрацией ЭДТА — 0,01 *M*. Концентрированный ферментный препарат хранили при —10°C. Для работы ферментный материал доводили до конечной концентрации белка — 10—20$\gamma$ в 0,1 мл. Стандартная среда инкубации (конечный объем 1 мл) содержала 100 м*M* NaCl, 20 м*M* KCl, 30 м*M* трис—HCl буфера, 0,1 мл ферментного препарата, pH 7,5. Соотношение между ионами магния и АТФ 1:1 (по 2 мМ). Реакцию после 15 мин преинкубации при 40° начинали введением в реакционную смесь динатриевой соли АТФ и через 5—15 мин прерывали 0,1 мл 50% ТХУК.

Для выявления активности Na, K-АТФазы в реакционную смесь вводили сердечный гликозид — олиторизид в конечной концентрации $10^{-3}$ M, Na, K-АТФазу определяли как разницу между количеством отщепленного от АТФ неорганического фосфора в присутствии гликозида и без него. Неорганический фосфат определяли по методу Туракулова и др. (1967), белок — по методу Lowry et al. (1951).

При исследовании кинетики гидролиза АТФ Na, K-активируемой АТФазой меняли состав среды инкубации для выявления влияния субстрата — АТФ, ионов-активаторов — натрия и калия, гликозида, pH среды и температуры инкубации. Результаты выражали в микромолях неорганического фосфата, рассчитанного на мг белка в час.

Данные по распределению АТФаз в различных зонах почек кроликов, крыс и сусликов, а также активности АТФаз в почках лягушек и черепах представлены в таблице. В почке кролика наибольшая активность транспортной АТФазы наблюдается в мозговой зоне, а активность в корковой и сосочковой зонах почти одинакова. Процент содержания Na, K-АТФазы от общей активности фермента высок в мозговой и корковой зонах и несколько ниже в сосочковой.

В почке крысы наименьшая активность фермента отмечается в коре. В мозговой и сосочковой зонах активность почти одина-

кова. В процентном отношении сосочек обладает наибольшим содержанием транспортной АТФазы.

Транспортные АТФазы во всех зонах почек сусликов, забитых непосредственно в местах обитания, имеют очень высокие значения как в отношении удельной активности фермента, так и в процентном содержании Na, K-АТФазы. Активность транспортного фермента в мозговой зоне почти в 2 раза, а в сосочковой — в 3 раза выше, чем в корковой. При сравнении активности Na, K-

**Распределение АТФазных активностей в почках**

| Зона почки | Активность АТФаз, мкмоль Фн/мг белка/ч | | | Содержание Na, K-АТФазы, % |
|---|---|---|---|---|
| | общая АТФаза | Mg-АТФаза | Na, K-АТФаза | |
| | | Кролик | | |
| Корковая | 91,9±4,72 | 25,4±3,27 | 66,5±1,68 | 72,3 |
| Мозговая | 164,4±6,07 | 46,0±2,84 | 118,5±5,50 | 72,1 |
| Сосочковая | 97,3±5,98 | 35,3±1,34 | 62,0±5,56 | 63,7 |
| | | Крыса | | |
| Корковая | 104,6±4,22 | 45,7±3,24 | 58,9±3,20 | 56,4 |
| Мозговая | 166,9±4,90 | 55,8±3,13 | 111,1±4,65 | 66,4 |
| Сосочковая | 141,9±4,52 | 37,4±3,64 | 104,5±4,17 | 73,5 |
| | | Суслик | | |
| Корковая | 147,7±1,89 | 28,2±2,29 | 119,6±0,90 | 81,0 |
| | 92,0*±9,00 | 35,4±9,15 | 56,7±2,33 | 62,9 |
| Мозговая | 316,1±29,36 | 13,2±1,13 | 303,0±30,00 | 95,8 |
| | 166,5*±8,86 | 56,2±7,26 | 110,2±7,63 | 66,3 |
| Сосочковая | 360,4±19,72 | 16,3±1,89 | 344,2±21,11 | 95,4 |
| | 95,6*±7,70 | 38,7±13,16 | 57,0±6,18 | 60,9 |
| | | Черепаха | | |
| Вся почка | 129,0±6,36 | 55,8±3,55 | 73,2±6,48 | 56,7 |
| | | Лягушка | | |
| Вся почка | 98,8±2,93 | 43,5±3,01 | 55,3±4,32 | 56,0 |

* Отмечены активности фермента, выделенного из почек сусликов, содержавшихся в виварии в течение 10 дней после отлова; без отметки — активности фермента, выделенного из почек сусликов, забитых в местах обитания.

АТФазы почек сусликов, содержавшихся в стационарных условиях вивария в течение 10 дней после отлова, отмечается резкое снижение активности общей и транспортной АТФазы, наиболее выраженное в сосочке. В этом случае распределение активности Na, K-АТФазы в разных зонах почек сусликов почти такое же, как у кроликов.

Удельная активность транспортной АТФазы почек черепах почти в 1,5 раза выше, чем почек лягушек, хотя процент содержа-

ния Na, K-АТФазы от общей активности фермента у них почти одинаков.

Для животных, находящихся в условиях дефицита воды, от концентрирующей способности почек, связанной с реабсорбцией воды в нефронах, во многом зависит возможность сохранения жизнеспособности. Процесс интенсивной реабсорбции воды в почечных канальцах в значительной мере обусловлен структурными особенностями выделительного аппарата.

Характер общего функционального состояния выделительной системы позвоночных животных находит отражение в размерах почек. Почечный индекс у грызунов аридной зоны выше, чем у непустынных млекопитающих. По данным Щегловой (1976), у большой песчанки из Каракумов этот индекс равен 4,61, у белой крысы — 3,76.

Функциональные особенности почек разных животных обнаруживают свою морфологическую основу в деталях тонкой внутренней дифференцировки их структуры. Это выявляется уже в соотносительном развитии главных структурных образований почек— коркового и мозгового отделов.

Изучение анатомической структуры изолированного нефрона показало, что как у низших, так и у высших позвоночных нефрон имеет клубочек, проксимальный, тонкий (промежуточный) и дистальный сегменты (Гончаревская, 1976, 1978). Относительная длина проксимального сегмента не увеличивается у речной миноги, европейского керчака, травяной лягушки, агамы, домашней курицы и белой крысы. Сравнение скорости проксимальной реабсорбции у миноги и крысы показало более высокий уровень реабсорбционной способности проксимального канальца крысы. Рост проксимальной реабсорбции в процессе эволюции почки позвоночных обусловлен интенсификацией канальцевого транспорта, а не увеличением длины проксимальных сегментов. У рептилий усложнение мочевых канальцев сопровождается возникновением неодинакового расположения популяций нефронов в почке. Содержание ионов и мочевины повышается от корковой к мозговой части почки. Этот процесс создается главным образом противоточной поворотной множительной системой мозгового вещества и обеспечивается либо длиной мозгового конуса, либо количеством петель в нем.

Sperber (1944) показал корреляцию между длиной петель, строением почек млекопитающих и степенью засушливости мест обитания. Он исследовал почки 139 видов млекопитающих с тщательными микродиссекциями, с изоляцией отдельных нефронов и измерением их частей. У 7 видов пустынных грызунов обнаружен очень длинный сосочек, свисающий в мочеточник. Эти животные продуцировали исключительно концентрированную мочу.

У животных, обитающих в условиях достаточного обеспечения водой, усиленного развития достигает кора почек с фильтрующим аппаратом, а также наружная зона мозгового вещества, где происходит обратное всасывание солей. У представителей аридных

областей наибольшее значение приобретает внутренняя зона мозгового вещества с очень крупным сосочком.

Концентрирующая способность почек свойственна только млекопитающим и отчасти птицам, у которых в петлях Генле и собирательных канальцах нефронов происходит реабсорбция воды и электролитов (Гончаревская, 1976). Этот аппарат сосредоточен в основном в мозговом веществе почек, степень развития которого зависит от приспособленности животных к дефициту воды. Поверхностные, короткопетельные нефроны достигают наружного мозгового слоя. Юкстамедуллярные, длиннопетельные нефроны создают противоточную множительную систему. Петля Генле представлена в основном тонким сегментом, вершина которого опускается в сосочек почки.

Определено, что у песчанки степень васкуляризации сосочка в 2,5 раза выше, чем коры (Гетманова, 1976). У ондатры сосочек васкуляризирован в 3 раза ниже, чем кора. Белая крыса занимает промежуточное положение. Обнаруженные различия автор объясняет экологической специализацией исследованных видов, свидетельствующей о важной роли сосудистой системы почек в обеспечении высокой концентрирующей способности. В ряду песчанка— белая крыса — ондатра степень васкуляризации сосочка снижается более чем в 4 раза, что соответствует уменьшению в том же ряду концентрирующей способности почек (осмолярность мочи у этих видов равна 5,5; 2,9; 1,1 осм соответственно).

В многочисленных работах Ю. В. Наточина и др. (Наточин, 1969, 1972, 1975, 1976; Наточин и др., 1975) представлены данные о структурном, функциональном и биохимическом развитии почек в эволюционном аспекте. Отмечается, что уровень реабсорбции натрия в почках теплокровных животных значительно выше, чем в почках холоднокровных. Повышение функциональной нагрузки клеток проксимальных канальцев сопровождается увеличением площади базальной мембраны вследствие увеличения ее складчатости. Транспорт натрия в дистальном канальце, в отличие от проксимального, происходит против большого градиента, что требует более существенных энерготрат. У крыс в просвете проксимального канальца концентрация натрия может снижаться до 108 мэкв/л по сравнению с 140 мэкв/л в плазме крови, в дистальном канальце концентрация натрия падает до 30—48 мэкв/л, в конечных отделах собирательных трубок она может уменьшаться до 1 мэкв/л и меньше. У млекопитающих в проксимальном канальце около 2/3 профильтрованного натрия всасывается и 1/4 реабсорбируется в петле Генле, 8—10% всасывается в конечных частях нефрона и собирательных трубках; почки выделяют лишь менее 1% профильтровавшегося натрия.

Возможность раздельной обработки воды и натрия в дистальном сегменте нефрона и собирательных трубках позволяет в широких пределах регулировать выделение воды почкой при одном и том же количестве экскретируемого натрия. Ввиду того, что в

почках млекопитающих происходит нарастание кортико-папиллярного натриевого градиента, реабсорбция натрия в дистальном сегменте нефрона и конечных его частях происходит против значительного трансканальцевого градиента.

Манусова (1973) отмечает, что в процессе эволюции в ряду позвоночных увеличивается количество натрия, реабсорбируемого в почке, а в клетках канальцев возрастает активность Na, K-АТФазы, являющейся важным компонентом системы активного транспорта. Обнаружена более высокая активность дегидрогеназ сукцината и α-кетоглютарата в клетках проксимальных и дистальных канальцев. У млекопитающих активность энзимов цикла Кребса в клетках проксимальных и дистальных канальцев значительно выше, чем у других классов позвоночных. Высокая активность большей части окислительных ферментов в почках млекопитающих обусловлена резким увеличением объема реабсорбции натрия в нефроне.

По данным Windhager, Giebisch (1965), средняя разница потенциала через стенку проксимального канальца нефрона крыс равна — 20 mV. Наиболее глубокий электрохимический градиент найден в эпителии дистального канальца, он равен приблизительно — 35—60 mV. В тонкой части петли Генле обнаружена низкая разница потенциала — 1—3 mV, в собирательных трубках она значительна — 14—16 mV. Авторы предполагают, что натрий активно транспортируется эпителиальными клетками терминальных собирательных трубок.

Сегменты нефрона, входящие в состав той или иной зоны почек млекопитающих, обладают неодинаковой транспортной и АТФазной активностью, что имеет важное функциональное значение. В процессе эволюции почек позвоночных отмечается резкое увеличение реабсорбции натрия и способность продуцировать гипертоническую мочу, что связано с появлением петли Генле и увеличением толщины медуллярного слоя, поэтому в этой зоне почек обнаруживается наибольшая активность Na, K-АТФазы. Высокая активность транспортной АТФазы во внешней медулле обусловлена наличием толстой восходящей части дистального канальца, в которой реабсорбция натрия осуществляется против глубокого электрохимического градиента (Martinez-Maldonado et al., 1969; Jorgensen, Skou, 1969; Hendler, Torretti, Epstein, 1971; Gutman et al., 1973; Юрасова, 1973; Epstein, Silva, 1974). Активность транспортной АТФазы в мозговом веществе в среднем в 2—4 раза выше, чем в корковой зоне.

Совершенствуя технику биохимического анализа, Schmidt et al., (1974), Schmidt, Horster (1978) могли провести определение активности Na, K-АТФазы на отдельных изолированных участках почечных канальцев. Результаты этих экспериментов подтвердили наличие наибольшей активности фермента в клетках восходящего отдела петли Генле и дистальном канальце и меньшей активности в клетках проксимального извитого и, особенно, прямого канальца.

Конечная реабсорбция натрия из канальцевой мочи происходит в конечных отделах собирательных трубок, здесь же происходит концентрирование мочи. Наличие активности Na, К-АТФазы в сосочковой зоне почек, которая включает тонкую часть петли Генле и собирательные трубочки, до сих пор оспаривается некоторыми исследователями. Однако в последнее время появились данные, свидетельствующие, что и в этой зоне почек присутствует активность транспортной АТФазы, сравнимая с активностью в корковой зоне (Schmidt, Dubach, 1969; Gutman et al., 1973; Wald et al., 1974).

В канальцевой моче в конечных отделах нефрона содержится меньше натрия (2—3 мМ на литр), чем в клетках папиллы (до 218 мМ на 1 кг сырого веса ткани почек крыс) (Юрасова, 1973), поэтому натрий, по-видимому, активно накачивается из канальцевой жидкости в клетки собирательных трубок, причем, против значительного концентрационного градиента. Вполне оправдано присутствие в этой зоне почек довольно высокой активности транспортной АТФазы.

Таким образом, данные по распределению Na, К-АТФазы в почках исследованных нами животных в основном совпадают с результатами других исследователей. Транспортная АТФаза мозговой зоны почек почти в 2 раза активнее фермента корковой зоны. Исключение составляют почки сусликов, забитых в местах обитания, у которых отношение между активностью Na, К-АТФазы медуллы и коры равно почти 3. Активность транспортной АТФазы коры и папиллы почек кроликов почти одинакова. В то же время активность ферментной системы папиллы почек крыс и, в ещё большей степени, сусликов ближе к активности фермента мозговой зоны. В этих экспериментах видна роль почечной Na, К-АТФазы в процессах адаптации организма к условиям среды и к величине почечной реабсорбции.

Как было сказано выше, почки сусликов, живущих в аридных и высокогорных зонах, имеют хорошо развитую зону мозгового вещества с крупным сосочком, и эта особенность строения почек позволяет им продуцировать мочу, более концентрированную, чем плазма крови. Возможно, этим и объясняется присутствие такой высокой активности транспортной АТФазы в почках сусликов, взятых на анализ непосредственно в местах обитания животных. При изменении условий, а именно, при содержании сусликов в виварии, наблюдалось значительное снижение активности Na, К-АТФазы во всех зонах почек: в коре — в 2 раза, в мозговой зоне — почти в 3; наибольшее снижение активности отмечалось в сосочке — почти в 6 раз.

Относительно низкая активность транспортной АТФазы сосочка почки кролика, возможно, связана с тем, что почки кролика продуцируют мочу гипотоничную по сравнению с почками крыс (у крыс — 2560—3000 мосм, у кроликов — 1502—1910 мосм; цифры взяты из «Сравнительной физиологии животных», 1977).

Активность почечной Na, К-АТФазы у холоднокровных животных ниже, чем у теплокровных (Наточин, 1976). Увеличение активности транспортной АТФазы у теплокровных коррелирует с

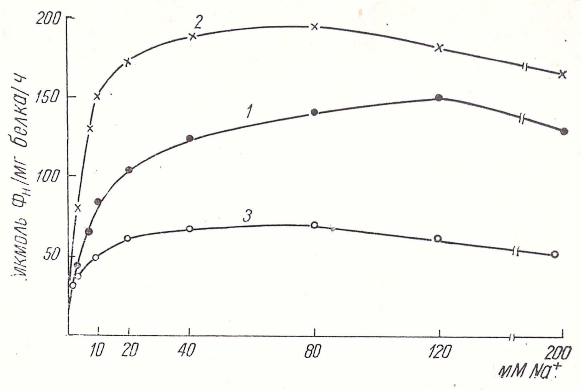



Рис. 1. Зависимость активности Na, К-АТФазы корковой (*1*), мозговой (*2*) и сосочковой (*3*) зон почек кролика от концентрации ионов натрия в присутствии 10 мМ $K^+$.

более высоким уровнем клубочковой фильтрации и большей интенсивностью работы клеточных систем транспорта натрия, что проявляется в возрастании реабсорбции этого иона из канальцевой мочи и способностью продуцировать концентрированную мочу.

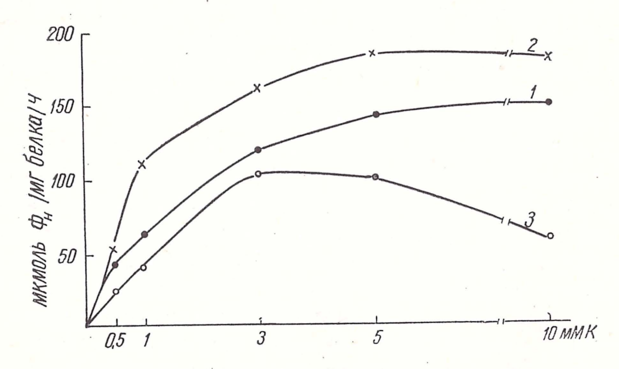


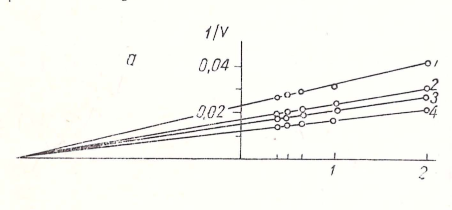

Рис. 2. Зависимость активности Na, К-АТФазы корковой (*1*), мозговой (*2*) и сосочковой (*3*) зон почек кролика от концентрации ионов калия в присутствии 120 мМ $Na^+$.

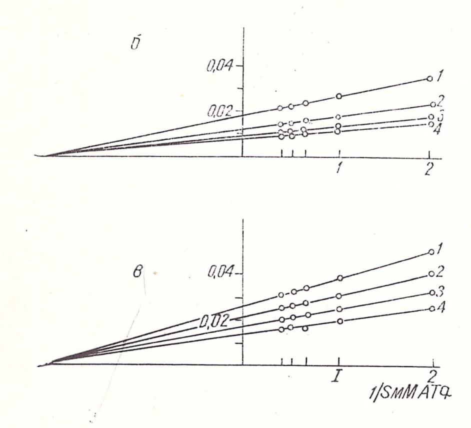
Известно, что рептилии и земноводные неспособны выделять гипертоническую мочу.

Таким образом, существует тесная взаимосвязь между уровнем реабсорбции натрия и активностью транспортной Na, К-АТФазы

вдоль нефрона, что отражает характер общего функционального состояния выделительной системы позвоночных и находится в непосредственной связи с экологической и водно-солевой адаптацией организма.

**Активация АТФазы натрием.** На фоне постоянной концентрации калия (10 мМ) исследовали влияние переменных концентраций натрия — от 2 до 200 мМ (рис. 1). Максимальная активность Na, K-АТФазы мозговой и сосочковой зон почек кролика наблюдалась при 80 мМ натрия, в корковой — при 120 мМ. Дальнейшее повышение концентрации натрия в среде ингибировало фермент. Полумаксимальная активация Na, K-АТфазы ($K_{0,5}$) натрием отмечена при 9; 6 и 5 мМ натрия для коры, медуллы и сосочка соответственно.



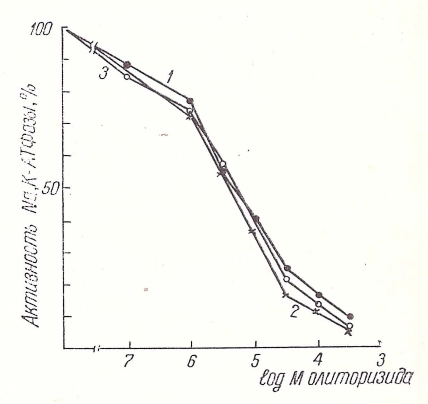




Рис. 3. Графики Лайнуивера—Берка для Na, К-АТФазы корковой (*а*), мозговой (*б*) и сосочковой (*в*) зон почек кролика.

*1*—$10^{-6}$ М, *2*—$10^{-5}$, *3*—$10^{-4}$, *4*—$10^{-3}$ М.

Рис. 4. Ингибирование Na, К-АТФазы корковой (*1*), мозговой (*2*) и сосочковой (*3*) зон почек кролика олиторизидом.

**Активация Na, K-АТФазы калием.** На фоне постоянной концентрации натрия (120 мМ) исследовали влияние возрастающих концентраций калия (от 0,5 до 10 мМ) (рис. 2). Максимальная активность фермента достигалась при 3 мМ калия в сосочковой зоне, при 5 мМ — в медулле. Активность фермента коры прогрессивно нарастала. Полумаксимальная активация Na, K-АТФазы ($K_{0,5}$) калием достигалась при 1,4; 0,8 и 1,2 мМ для коры, медуллы и сосочка соответственно. Транспортная АТФаза мозговой зоны проявляет наибольшую чувствительность как к ионам нат-

рия, так и к ионам калия, в то время как фермент папиллы обладает высокой чувствительностью к ионам натрия, но меньшей к ионам калия.

**Влияние субстрата на активность Na, K-АТФазы.** Микросомальные препараты инкубировали в среде, содержащей 100 мМ натрия и 20 мМ калия, а также переменные эквимолярные концентрации ионов магния и АТФ (от 0,5 до 2,5 мМ) (рис. 3). По графикам Лайнуивера—Берка рассчитывали значения $K_м$ для АТФ: 0,408; 0,476 и 0,444 мМ для коры, медуллы и сосочка соответственно.

**Игнибирование олиторизидом.** Исследовали влияние разных концентраций олиторизида (от $10^{-7}$ до $5 \cdot 10^{-4}$ М) на степень ин-

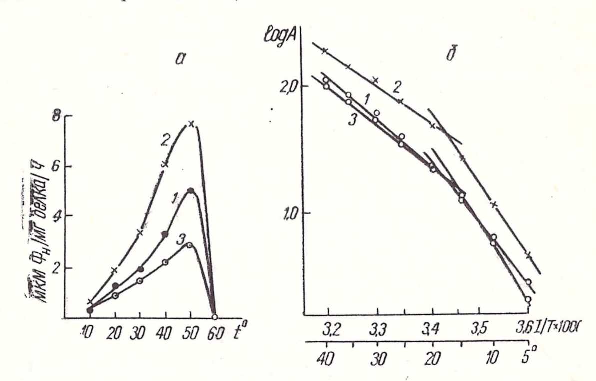



Рис. 5. Влияние температуры инкубации (*а*) и графики Аррениуса (*б*) Na, K-АТФазы корковой (*1*), мозговой (*2*) и сосочковой (*3*) зон почек кролика.

гибирования микросомальной Na, K-АТФазы корковой, мозговой и сосочковой зон. Концентрация олиторизида, необходимая для 50% ингибирования транспортной АТФазы ($K_i$), для всех зон оказалась почти одинаковой: для коры и сосочка — $7 \cdot 10^{-6}$ М, для фермента мозговой зоны — $6 \cdot 10^{-6}$ М (рис. 4).

**Эффект pH среды инкубации.** Ферментный препарат инкубировали в стандартной среде с переменным значением pH (от 4,0 до 9,0). Оптимум pH для Na, K-АТФазы всех зон почек отмечался при 7,5, для Mg-АТФазы — при щелочных значениях pH — от 8 до 9.

**Влияние температуры инкубации на активность Na, K-АТФазы.** Максимальная активность транспортной АТФазы во всех зонах почки отмечалась при 50°С (рис. 5). По графикам Аррениуса были вычислены кажущиеся величины энергии активации для Na, K-АТФазы. $E_{a20-40°}$ равны 13840±460; 12710±500 и 13490±480 кал/моль в корковой, мозговой и сосочковой зонах соответственно, $E_{a5-15°}$ —24700±1820; 27460±990 и 27840±2600 кал/моль. Изло-

мы на графиках температурной зависимости скорости гидролиза АТФ наблюдались в области 19° для фермента коры, 18° для мозговой зоны и 16°С для сосочка.

Таким образом, обнаружены некоторые различия в чувствительности к ионам натрия и калия транспортной АТФазы, выделенной из коры, медуллы и сосочка почки кролика. Наибольшая чувствительность к ионам проявлялась у фермента мозговой зоны. $K_{0,5}$ для натрия у Na, K-АТФазы сосочка имела низкое значение, еще меньшая чувствительность отмечалась к ионам калия. Что касается влияния субстрата, гликозида, pH среды и температуры инкубации, то здесь не было обнаружено сколько-нибудь существенных отличий в поведении фермента.

Кинетические свойства транспортной Na, K-активируемой АТФазы почек изучались многими исследователями. Nechay et al., (1971), исследовавшие фермент из почки человека, указывают, что $K_м$ для $K^+$ равна 1,1 мМ в присутствии 100 мМ натрия, $K_м$ для натрия — 7,9 мМ в присутствии 20 мМ калия, концентрация для полумаксимального ингибирования фермента оуабаином $2{,}3 \cdot 10^{-6}$ М. Braughler, Corder (1977) определили, что $K_м$ для натрия при 20 мМ калия равна 16 мМ (т. е. почти в 2 раза выше, чем у предыдущих авторов), а $K_м$ для калия в присутствии 100 мМ натрия 1,5 мМ, $K_i$ оуабаином $= 1{,}8 \cdot 10^{-6}$ М.

Kline et al. (1971), работая на ферменте из мозга быка, нашли, что $K_м$ для АТФ равна 0,4 мМ, $K_i$ для оуабаина — $8$—$80 \cdot 10^{-6}$ М, т. е. ингибирование происходило при гораздо больших концентрациях гликозида.

Geering, Rossier (1979), изучая кинетику Na, K-АТФазы, выделенной из почки жабы, пришли к заключению, что $K_{0,5}$ для натрия составляет 12,29 мМ, для калия — 1,14 мМ, $K_м$ АТФ — 0,40 мМ, $K_i$ для оуабаина — 35 мк. Они отмечали 2 пика активации при температуре 37 и 50°С. Излом на графике Аррениуса наблюдался при 15°С.

Wald et al. (1974) провели исследование кинетических свойств Na, K-АТФазы по зонам почки крысы: $K_{0,5}$ для натрия $= 9$; 7,1 и 7,5 мМ в присутствии 10 мМ калия в корковой, мозговой и сосочковой зонах соответствено. $K_{0,5}$ для калия $= 0{,}75$; 0,67 и 0,93 в присутствии 100 мМ натрия. Эти авторы выявили большую чувствительность фермента мозговой зоны почек крыс к ионам натрия и калия, тогда как фермент сосочка проявлял высокую чувствительность к ионам натрия, но меньшую — к ионам калия. Na, K-АТФаза папиллы оказалась более чувствительной к АТФ ($K_м =$ 0,55, в отличие от 1,34 мМ для медуллы и 1,21 мМ для фермента коры) и к ингибитору ($K_i = 1{,}64 \cdot 10^{-4}$ М против 2,95 и $2{,}45 \cdot 10^{-4}$ М в медулле и коре соответственно). На основании полученных результатов авторы высказали предположение о функциональном различии микросомальной Na, K-АТФазы из разных зон почек крыс.

Для сравнения приведем данные кинетических параметров Na, K-АТФазы плазматических мембран щитовидной железы свиньи (Yukifumi, Toichiro, 1977), подтвердившие, что свойства этого фермента из щитовидной железы схожи с характеристиками Na, K-АТФазы других органов: $K_м$ для калия в присутствии 100 мМ натрия = 1,6 мМ, для натрия в присутствии 5 мМ калия — 12 мМ, $K_м$ для АТФ — 0,14 мМ. График температурной зависимости активности фермента в аррениусовых кривых имел излом в области 22°, энергия активации = 24,2 ккал/моль при 5—22° и 19,0 при 22—40°.

Ранее мы сообщали (Юрасова и др., 1979) о влиянии АТФ и олиторизида на активность Na, K-АТФазы почечных зон кролика и крыс. $K_м$ для АТФ лишь для фермента сосочковой зоны почек крыс была в 2 раза ниже, чем для всех остальных зон почек кроликов и крыс (0,238 мМ против 0,408—0,470 мМ). В то же время фермент почек крыс оказался менее чувствительным к ингибированию олиторизидом по сравнению с ферментом почек кролика ($K_i = 10^{-4}$ М против $6—7 \cdot 10^{-6}$ М). Был сделан вывод, что выявленные особенности Na, K-АТФазы из различных зон почек указывают на функциональную неоднородность этой ферментной системы вдоль нефрона.

Таким образом, основные свойства, присущие транспортной Na, K-активируемой АТФазе, незначительно отличаются у разных видов животных, из тканей которых была выделена ферментная система. По мнению Хочачка и Сомеро (1977), специфические свойства фермента (векториальный компонент, константы сродства, потребность в противоионах) могут быть у разных видов различными, но общая стехиометрия, последовательность связывания натрия и других веществ, т. е. общая природа активных участков на белковой молекуле, согласно принятым представлениям, в основе своей одинакова у всех животных, у которых имеется Na, K-АТФаза.

Изучение кинетики поведения транспортного фермента почек разного вида животных с разным уровнем транспортных процессов в почке позволяет выявить некоторые особенности Na, K-АТФазы вдоль нефрона, что может указывать на их корреляцию с функциональными различиями разных сегментов нефрона.

Основываясь на приведенных выше данных, можно сделать следующие выводы.

Наибольшая активность Na, K-АТФазы отмечается в мозговой зоне всех исследованных животных. Активность транспортной АТФазы в сосочковой зоне почек крысы и суслика, забитых непосредственно в местах обитания, так же велика, как и в мозговой зоне. По-видимому, высокая активность фермента в этих зонах обусловлена реабсорбцией натрия против глубокого концентрационного градиента, который у этих животных нарастает по направлению от коры к папилле. Наименьшая активность транспорт-

ной АТФазы отмечена в почках черепахи и лягушки. Эти животные неспособны продуцировать концентрированную мочу, и почки их характеризуются низким уровнем фильтрационно-реабсорбционных процессов.

Существует корреляция между уровнем реабсорбции натрия и концентрированием мочи, с одной стороны, и активностью Na, K-АТФазы вдоль нефрона — с другой, что зависит от общего функционального состояния выделительной системы позвоночных.

При изучении кинетики Na, K-АТФазы микросом, выделенных из разных зон почек кролика, получены следующие характеристики фермента: $K_{0,5}$ для натрия в присутствии 10 мМ калия=9; 6 и 5 мМ для коры, мозговой и сосочковой зон соответственно; $K_{0,5}$ для калия в присутствии 120 мМ натрия=1,4; 0,8 и 1,2 мМ; $K_м$ АТФ для фермента коры, медуллы и сосочка=0,408; 0,476 и 0,444 мМ; $K_i$ для олиторизида равно для фермента мозговой зоны $6\cdot10^{-6}$ М, для коры и сосочка — $7\cdot10^{-6}$ М. Фермент мозговой ткани проявляет высокую чувствительность к ионам натрия и калия, Na, K-АТФаза папиллы имеет низкое значение $K_{0,5}$ для натрия и обладает меньшей чувствительностью к ионам калия.

Эти данные свидетельствуют о наличии функциональных особенностей транспортных процессов и о неоднородности транспортной Na, K-активируемой АТФазы вдоль нефрона.

## ЛИТЕРАТУРА


Бекмухаметова З. У. 1975. Гормональная регуляция транспорта ионов. Ташкент.

Болдырев А. А., Твердислов В. А. 1978. Молекулярная организация и механизм функционирования Na-насоса. «Биофизика». Итоги науки и техники. ВИНИТИ АН СССР, т. 10. М.

Веренинов А. А. 1978. Транспорт ионов через клеточную мембрану. Л.

Гетманова Т. Н. 1976. «Журн. эволюц. биохим. и физиол.», **XII**, 128.

Гончаревская О. А. 1976. «Журн. эволюц. биохим. и физиол.», **XII**, 113.

Гончаревская О. А., Аманова М. А., Бахтеева В. Т. 1978. «Физиол журн. СССР», **64**, 405.

Лишко В. К. 1977. Натриевый насос биологических мембран. Киев.

Манусова Н. Б. 1973. «Журн. эволюц. биохим. и физиол.», **9**, 209.

Наточин Ю. В. 1969. «Журн. эволюц. биохим. и физиол.», **5**, 240.

Наточин Ю. В. 1972. «Журн. эволюц. биохим. и физиол.», **8**, 289.

Наточин Ю. В. 1975. Структура и функция биологических мембран. М., 307.

Наточин Ю. В. 1976. Ионорегулирующая функция почки. Л.

Наточин Ю. В. 1975. «Журн. эволюц. биохим. и физиол.», **XI**, 45.

Сравнительная физиология животных. 1977. **I**. М.

Туракулов Я. Х., Кургульцева Л. И., Гагельганс А. И. 1967. «Биохимия», **32**, 106.

Хочачка П., Сомеро Дж. 1977. Стратегия биохимической адаптации. М.

Щеглова А. И. 1976. Физиологические приспособления млекопитающих пустыни. Л.

Юрасова Т. Ф. 1973. Исследование особенностей транспорта ионов в разных зонах почек крыс. Автореф. канд. дисс., Ташкент.

Юрасова Т. Ф., Бекмухаметова З. У., Ташпулатов Э. 1979, «Узб. биол. журн.», № 5, 9.

Bonting S. L., Cagavaggio L. L. 1963. Arch. Biochem. Biophys., **101**, 37.

Bonting S. L., Simon K. A. K., Hawkins N. M. 1965. Arch. Biochem. Biophys., **95**, 416.
Braughler J. M., Corder C. N. 1977. Biochim. Biophys. Acta, **481**, № 2, 313.
Epstein F. H., Silva P. 1974. Ann. N. Y. Acad. Sci., **242**, 519.
Geering K., Rossier B. C. 1979. Biochim. Biophys. Acta, **566**, 157.
Gutman Y., Wald H., Czaczkes W. 1973. Pflügers Arch., **345**, 81.
Hendler E. D., Torretti J., Epstein F. H. 1971. J. clin. Invest.. **50**, 1329.
Jorgensen P. L., Skou J. Chr. 1969. Biochem. Biophys. Res. Communs, **37**, № 1, 39.
Kline M. H. et al. 1971. Arch. Biochem. Biophys., **147**, 781.
Lowry O. H. et al. 1951. J. Biol. Chem., **193**, 265.
Martinez Maldonado M. et al. 1969. Science, **165**, 807.
Nechay B. R. et al. 1971. Feder. Proc., Abs., **30**, № 2, 332 A.
Schmidt U., Dubach U. C. 1969. Pflügers Arch., **306**, 219.
Schmidt U. et al. 1974. Ann N. Y. Acad. Sci., **242**, 489.
Schmidt U., Horster M. 1978. Methods in Pharmacol., **413**, 259.
Skou J. Chr. 1957. Biochim. Biophys. Acta, **23**, 394.
Sperber I. 1944. Zoologiska bidrad frän., Upsala, **22**, 249.
Wald H., Gutman Y., Czaczkess W. 1974. Pflügers Arch., **352**, 47.
Windhager E. E., Giebisch G. 1965. Physiol. Rev., **45**, № 2, 214.
Yukifumi N., Toichiro H. 1977. J. Biochem., **81**, 721.

# МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ МЕМБРАНОАКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

А. В. ШКИНЁВ, А. И. ГАГЕЛЬГАНС, Б. А. ТАШМУХАМЕДОВ

## МЕМБРАНОАКТИВНЫЕ СВОЙСТВА СИНТЕТИЧЕСКИХ ИОНОФОРОВ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

В настоящее время не вызывает сомнений важная структурно-функциональная роль мембранных систем клетки. Фотосинтез, трансформация энергии, передача информации и другие процессы, необходимые для жизнедеятельности клетки, осуществляются биомембранами и ассоциированными с ними полиферментными системами. Одной из ведущих проблем комплексного исследования организации и принципов функционирования биомембран является проблема ионного транспорта, так как он играет ключевую роль в механизмах функционирования клеточных систем.

Особенно важна роль мембраноактивных соединений. Как отмечают Ю. А. Овчинников и др. (1974), «не будет преувеличением сказать, что прогресс, достигнутый в последние годы в изучении мембранных явлений, в значительной мере связан с широким использованием антибиотиков, избирательно увеличивающих катионную проницаемость биологических мембран». Соединения микробного происхождения имеют готовую макроциклическую структуру или образуют её с помощью водородных связей (Овчинников и др., 1974; Maier, Paul, 1971; Truter, 1976; Овчинников, 1978). Кроме антибиотиков в настоящее время в исследованиях мембранного транспорта широко применяются синтетические макроциклические соединения (Caroni et al., 1977; Wun, Bittman, 1977; Harris et al., 1977; Wun et al., 1977; Deber et al., 1978; Овчинников, 1978; Ташмухамедов и др., 1979). Особый интерес в связи с доступностью, широкими возможностями применения и анализа структурно-функциональных взаимосвязей представляют макроциклические полиэфиры (иногда их называют краун-эфирами или краун-соединениями), синтез которых впервые осуществил Pedersen (1967).

Соединения природного или синтетического происхождения, облегчающие трансмембранную диффузию ионов, с молекулярной массой в пределах 200—2000 дальтон получили название ионофоров (Truter, 1976; Shamoo, Goldstein, 1977). Термин «ионофор» введен Moore, Pressman (1964) после открытия феномена стимуляции некоторыми антибиотиками поглощения ионов $K^+$ суспен-

зией метаболизирующих митохондрий. Ионофоры увеличивают потоки или включение какого-либо иона (в основном это ионы щелочных или щелочноземельных металлов) из водной фазы в гидрофобную (Truter, 1976; Shamoo, Goldstein, 1977) и облегчают транспорт ионов через природную или искусственную бислойную липидную мембрану (БЛМ) (Truter, 1976). Это не означает, однако, обязательного участия ионофора в транспорте ионов через биологические мембраны или БЛМ; транспортные функции могут подразумеваться лишь в том случае, когда ионофор выделяется из природной ионтранспортирующей системы. Большинство же известных антибиотиков, а также краун-эфиры и другие синтетические мембраноактивные комплексоны, как известно, не играют какой-либо роли в биологических системах транспорта ионов (Shamoo, Goldstein, 1977).

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИОНОФОРОВ И ДРУГИХ ИНДУКТОРОВ ПРОНИЦАЕМОСТИ МЕМБРАН

По определению Truter (1976), ионофоры характеризуются следующими особенностями: а) наличием в молекуле достаточного количества атомов кислорода (или, реже, азота) для образования сольватной оболочки комплексируемого катиона; б) присутствием определенных радикалов для придания липофильности наружной поверхности комплекса ионофор—катион. Образующийся комплекс может быть заряжен положительно, т. е. молекула собственно ионофора нейтральна по суммарному заряду (группа нейтральных ионофоров), или не несет заряда, в этом случае сам ионофор представляет собою анион и относится к группе карбоксилатных ионофоров (Truter, 1976; Pressman, 1976; Gomez-Puyou, Gomez-Lojero, 1977).

Для ионофоров характерна высокая селективность процесса образования комплекса с ионом и его транспорта через мембрану, что обусловлено особенностями строения ионофоров. Определяющими параметрами этих активностей являются динамические конформационные характеристики соединения (Shemyakin et al., 1969; Pressman, 1976). Часто высокая избирательность обеспечивается образованием неэквимолярных комплексов типа «сэндвича» ионофор:катион (2:1, 3:1, 3:2), наиболее часто встречающихся в ионных комплексах краун-эфиров (Pedersen, 1970).

Ионофоры обеспечивают оптимальную кинетику процесса транслокации иона: эффективный транспорт предполагает достаточно высокую скорость движения переносчика в мембране — до $10^5$ ионов/с (Pressman, 1976; Овчинников, 1978). Константа связывания должна быть оптимальной по величине, так как образование и распад комплекса ионофор:катион на соответствующих сторонах мембраны должны происходить с максимальной скоростью. Таким образом, ионофоры обладают уникальными свойствами.

Кроме мобильных переносчиков (ионофоров) в исследованиях на мембранах различного происхождения широко используются молекулы, ассоциирующие друг с другом или взаимодействующие с липидами мембраны, формируя водные поры или каналы, пригодные для свободной диффузии иона, так называемые «квази»-ионофоры (Pressman, 1976), «каналоформеры» (Gomez-Puyou, Gomez-Lojero, 1977), или «ионопроводы» (Овчинников, 1978).

Каналоформеры отличаются от ионофоров следующими особенностями. Проводимость БЛМ в присутствии каналоформеров пропорциональна n-й степени концентрации соединения; имеет величину для грамицидина — 2 (Tosteson et al., 1968), для моназомицина — 5 (Mueller, Finkelstein, 1972), для аламетицина — 6 (Mueller, Rudin, 1968) и для нистатина — до 12 (Finkelstein, Cass, 1968), что, по-видимому, объясняется ассоциацией нескольких мономеров в один функционально активный канал. В формировании некоторых каналов участвуют и липиды мембраны, что установлено, например, при образовании каналов полиеновыми антибиотиками (Борисова, 1979). При формировании канала в БЛМ наблюдаются дискретные скачки проводимости (Gordon, Haydon, 1972; Eisenberg et al., 1973; Bean, 1978; Борисова, 1979), обусловленные, вероятно, как образованием и распадом индивидуальных пор, так и их переходами между «открытым» и «закрытым» состояниями в зависимости от ориентации относительно плоскости мембраны.

С увеличением радиуса Стокса уменьшается проницаемость каналов для неэлектролитов (Finkelstein, Cass, 1968; Finkelstein, 1970).

При использовании «замороженной» мембраны ионофоры неактивны, тогда как эффект грамицидина А в этих условиях меняется незначительно (Krasne et al., 1971). Однако в случае эффектов валиномицина на БЛМ из пальмитоиллецитина этот вывод, по-видимому, неверен, так как при снижении температуры отмечено значительное уменьшение коэффициента распределения ионофора в системе БЛМ-вода (Benz et al., 1973).

## НЕЙТРАЛЬНЫЕ ИОНОФОРЫ

**Валиномицин** впервые был выделен Brockmann, Shmidt-Kastner (1955), его структура установлена с применением оптических спектральных методов Шемякиным и др. (1963) и затем подтверждена рентгеноструктурным анализом (Nawata et al., 1975). Валиномицин разобщает окислительное фосфорилирование (McMurray et al., 1959), однако механизм действия антибиотика как калиевого ионофора был выяснен значительно позже (Moore, Pressman, 1964). Из всех существующих ионофоров только валиномицин проявляет высочайшую $K^+/Na^+$-избирательность ($10^4$), что обусловлено его уникальной пространственной структурой

(Овчинников, 1978). Синтезированы также многочисленные аналоги валиномицина, позволившие установить связь между его химическим строением и биологическими свойствами, детально рассмотренными в ряде монографий (Овчинников и др., 1974; Овчинников, 1978) и обзоров (Pressman, 1976; Bakker, 1979).

**Группа энниатина.** Энниатины А, В и С состоят из остатков оксиизовалериановой кислоты, и, соответственно из остатков N-метил-L-изолейцина, N-метилвалина и метиллейцина (Gâumann et al., 1947; Plattner et al., 1948). Впоследствии энниатином С был назван синтетический циклогексапептид (Михалева и др., 1968; Овчинников, 1974). Со всеми комплексируемыми катионами энниатины образуют комплексы состава 1:1, однако по устойчивости калиевых комплексов значительно уступают другим металлсвязывающим макроциклам, для них также характерна низкая $K^+/Na^+$-избирательность (Овчинников, 1978).

**Макротетралидные нактины** — циклические полиэфиры, классифицируемые по числу этильных радикальных групп (Beck et al., 1962). Нактины — первые полиэфиры с большим кольцом (32 атома), для которых была определена конформация молекул (Kilbourn et al., 1967). В серии нактинов при переходе к высшим гомологам отмечается увеличение антибиотической активности (Meyers et al., 1965), констант комплексообразования (Прессман, 1978), $K^+/Na^+$-селективности, что подтверждается повышением способности активировать АТФазу митохондрий (Graven et al., 1966). Установлена способность тетранактина (Oishi et al., 1970) переносить $Na^+$ из водной фазы в органическую (Ando, Nawata, 1978). Применение нактинов как ионофоров ограниченно (Овчинников, 1978).

**Макроциклические полиэфиры.** Реакция конденсации эпоксиэтилена с резорцинолом в присутствии КОН как конденсирующего агента приводит к образованию $K^+$-селективного ионофора, названного дибензо-18-короной-6 (рис. 1); 18 обозначает число атомов в кольце, 6 — число лигандных атмомов кислорода (Pedersen, 1967) (табл. 1). К настоящему времени синтезировано более 200 представителей этого перспективного класса нейтральных ионофоров, различающихся размерами цикла, природой лигандных атомов и заместителей, комплексонными свойствами и биологической активностью (Christensen et al., 1974; Pressman, 1976; Harris et al., 1977; Ташмухамедов и др., 1979; Tashmukhamedov et al., 1980).

Работы, проводимые в нашей лаборатории (Ташмухамедов и др., 1979; Шкинёв и др., 1979 а, б) показали, что модификация 15- и 18-членных макроциклов существенно увеличивает мембранную активность этих краун-эфиров.

Мы исследовали различные диацилпроизводные дибензо-18-короны-6 (соединения 1—9, табл. 1) на мембранах митохондрий и саркоплазматического ретикилума (СР). Синтез диацильных производных описан ранее (Ташмухамедова и др., 1978 а, б).

Митохондриальные мембраны — классический объект для исследования ионофорных свойств различных соединений (Овчинников, 1974). В табл. 1 приведены данные по влиянию различных диацилпроизводных дибензо-18-короны-6 (соединения 1—9) на проницаемость внутренних мембран митохондрий для нитратов различных одно- и двухвалентных катионов. Поскольку нитрат является проникающим анионом (Brierley, 1974), энергонезависимое набухание митохондрий лимитируется только скоростью трансмембранного переноса исследуемого катиона.

Рис. 1. Структурная формула дибензо-18-короны-6 (Pedersen, 1967). В случае ацильных производных циклополиэфира $R_1=R_2$ и означает ацетил-, пропионил-, бутирил- и т. д.

Исходные циклополиэфиры — 18-корона-6 и дибензо-18-корона-6 в концентрации 5 мкМ практически не влияют на проницаемость митохондрий, в то время как исследованные диацилпроизводные дибензо-18-короны-6 обладают значительным ионофорным эффектом. Наибольшее увеличение проницаемости вызывают диацилпроизводные, содержащие цепочку из 4—5 атомов углерода при бензольных кольцах (соединения 3—5). При этом соединение 5, обладающее максимальным эффектом, практически не проявляет селективности по отношению к одновалентным катионам.

Таблица 1

**Влияние различных диацилпроизводных дибензо-18-короны-6 ($5\times10^{-5}$ М) на скорость энергонезависимого набухания митохондрий ($\Delta E_{520}$/мин) в различных солевых средах**

| N соединения | $R_1=R_2$ | ($\Delta E_{520}$/мин)·100 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | $Ca^{2+}$ | $Mg^{2+}$ | $H^+$ | $K^+$ | $Na^+$ |
| | Контроль | 15,4 | 0,5 | 2,2 | 4,5 | 1,6 |
| 1 | Ацетил | 15,4 | 0,5 | 2,9 | 4,6 | 2,0 |
| 2 | Пропионил | 19,0 | 6,0 | 7,3 | 6,8 | 1,7 |
| 3 | Бутирил | 39,5 | 10,0 | 15,2 | 6,7 | 1,8 |
| 4 | Бутирил (цис) | 36,1 | 9,3 | 13,9 | 7,1 | 1,8 |
| 4а | Бутирил (транс) | 48,9 | 20,0 | 15,8 | 6,8 | 2,0 |
| 5 | Валерил (транс) | 60,0 | 25,0 | 44,0 | 47,2 | 9,6 |
| 6 | Гексаноил | 30,8 | 2,7 | 14,9 | 14,8 | 2,3 |
| 7 | Гептаноил | 21,4 | 2,0 | 9,8 | 10,3 | 1,8 |
| 8 | Октаноил | 15,8 | 0,6 | 2,7 | 4,9 | 1,8 |
| 9 | Бензоил | 15,7 | 0,52 | 2,2 | 4,6 | 1,6 |

Примечание. Во всех случаях, кроме оговоренных особо, использовались смеси изомеров ($R_1$—заместитель в положении 4′, $R_2$—в положении 4″ или 5″ бензольного кольца, см. также рис. 1).

Соединение 4а существенно увеличивает проницаемость для $Ca^{2+}$ и $Mg^{2+}$ уже в концентрации 10 мкМ. Повышение концентрации до 50 мкМ вызывает резкое увеличение проницаемости для ионов $Ca^{2+}$ и более слабое — для $Mg^{2+}$; проницаемость для одновалентных катионов при этом практически не изменяется (рис. 2).

Укорочение или дальнейшее увеличение (соответственно соединения 1,2 и 6—8) углеводородной цепочки ацильной группы, а также замена ее на бензоил (соединение 9) приводит к снижению эффективности действия комплексона. Следует отметить, что все диацильные производные индуцируют значительную проводимость по водороду.

Изменение проницаемости мембран митохондрий в присутствии диацильных производных может быть продемонстрировано также

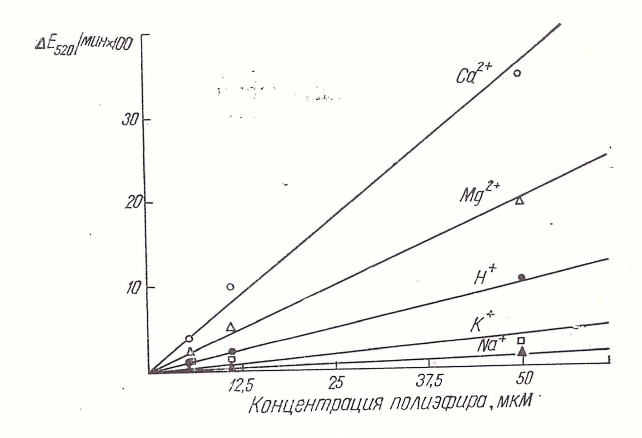
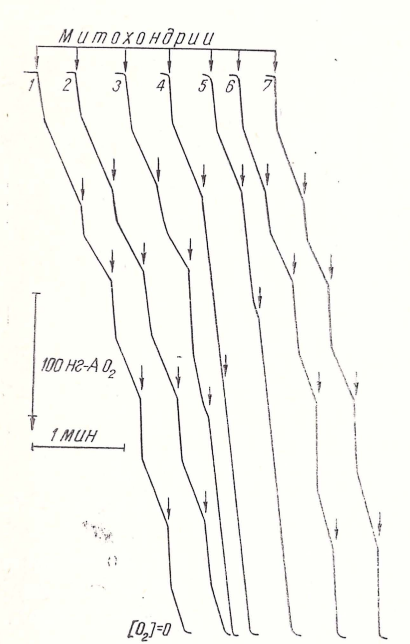



Рис. 2. Влияние соединения 4а на набухание митохондрий в присутствии одно- и двухвалентных катионов.

в опытах на энергизованных митохондриях в условиях транспорта $Ca^{2+}$. На добавление небольших количеств $Ca^{2+}$ энергизованные митохондрии отвечают кратковременной стимуляцией дыхания (рис. 3). Циклы активации дыхания, которые могут быть повторены несколько раз, обусловлены использованием энергии мембранного потенциала на транспорт ионов $Ca^{2+}$ внутрь митохондрий с помощью эндогенного кальциевого переносчика. В присутствии некоторых комплексонов (А 23187, простагландины) добавление $Ca^{2+}$ к энергизованным митохондриям вызывает не циклическую, а длительную стимуляцию дыхания (Reed, Lardy, 1972; Malmström, Carafoli, 1975). Причиной этого является индуцированный комплексоном циклический обмен содержащегося внутри митохондрий $Ca^{2+}$ на наружный $H^+$. Аналогично действуют соединения 4а и в меньшей степени — 2 и 5, что коррелирует с влиянием исследованных циклополиэфиров на проницаемость митохондрий.

Система транспорта двухвалентных катионов в митохондриях печени не взаимодействует с ионами магния, поэтому дыхание митохондрий при добавлении этого катиона, в отличие от $Ca^{2+}$, не активируется (рис. 4), однако в присутствии 50 мкМ соединения 4а добавление $Mg^{2+}$ вызывает 6-кратную стимуляцию дыхания митохондрий. Таким же эффектом обладают, как и в других описанных выше экспериментах, только соединения 2 и 5.

Генерация на внутренней мембране митохондрий электрической разности потенциалов со знаком «минус» внутри органелл (Mitchell, 1968) позволяет использовать их как идеальную систему для исследования электрофоретического перемещения катионов с помощью нейтральных ионофоров, в частности валиномицина (Овчинников и др., 1974), линейного кальциевого комплексона (Caro-



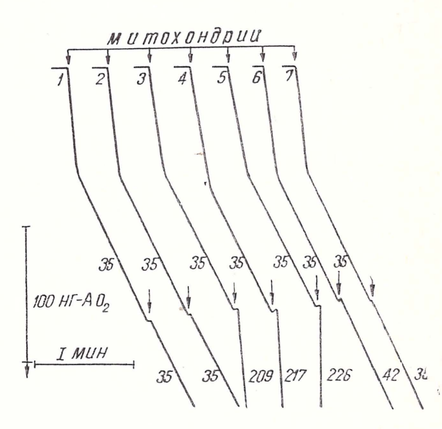




Рис. 3. Действие диацилпроизводных (1—9) дибензо-18-короны-6 ($5 \cdot 10^{-5}$ М) на дыхание митохондрий печени крыс в присутствии 200 нМоль $Ca^{2+}$.

*О*—контроль; стрелками обозначен момент добавления $Ca^{2+}$.

Рис. 4. Действие диацилпроизводных дибензо-18-короны-6 ($5 \cdot 10^{-5}$ М) на скорость дыхания митохондрий в присутствии 5 мМ $Mg^{2+}$ (момент добавления показан стрелкой). Обозначения те же, что и на рис. 3. Цифрами у полярограмм отмечена скорость дыхания, нг-атомы кислорода/мин·мг белка.

ni et al., 1977), митохондриального переносчика двухвалентных катионов. Рис. 5 (*а, б*) демонстрирует способность соединения 4а промотировать транспорт $Ca^{2+}$ в митохондриях, собственная система переноса двухвалентных катионов которых заблокирована рутениевым красным. В присутствии дибутирилпроизводного митохондрии транспортируют $Ca^{2+}$ даже на фоне ингибитора, од-

нако с меньшей скоростью, чем интактные органеллы. Рутениевый красный не влияет на кальциевую проницаемость митохондрий, индуцированную соединением 4а (рис. 5, *в*). При использовании более высоких концентраций циклополиэфира описанный выше индуцированный транспорт $Ca^{2+}$ в митохондриях не происходит, очевидно, из-за индукции существенной проводимости по $H^+$. Характерно, что нейтральный кальциевый ионофор, исследованный Carafoli (Caroni et al., 1977), индуцирует проводимость мембран митохондрий по $H^+$.

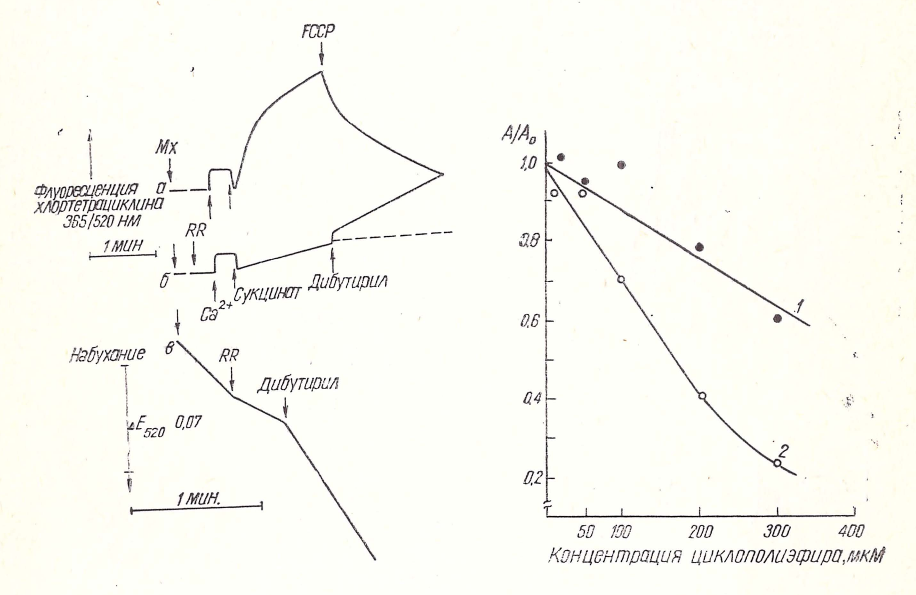



Рис. 5. Влияние соединения 4а на кинетику энергозависимого поглощения $Ca^{2+}$ митохондриями (*а*, *б*) и кинетику энергонезависимого набухания митохондрий в 0,08 М нитрате $Ca^{2+}$ (*в*) в присутствии рутениевого красного (РК).

*а*—контроль; пунктиром показан ход кривой в отсутствие циклополиэфира, стрелками—моменты добавления соединений.

Рис. 6. Влияние циклополиэфира 4а на величину относительного изменения Са-зависимой АТФазной активности (*1*) и коэффициента $Ca^{2+}$ / АТФ саркоплазматического ретикулума мышц кролика (*2*).

Индукция циклополиэфирами набухания деэнергизованных митохондрий в растворах нитратов двухвалентных катионов свидетельствует об «электрогенном» характере осуществляемого ими переноса катионов. Вместе с тем, способность этих соединений вызывать проницаемость по $H^+$ приводит в случае энергизованных митохондрий к более сложным функциональным эффектам, которые в значительной мере зависят от концентрации полиэфира.

Кальциевые ионофоры, описанные в литературе (табл. 2), как правило, ингибируют аккумуляцию $Ca^{2+}$ в саркоплазматическом

Таблица 2

**Некоторые характеристики ионофоров для двухвалентных катионов**

| Соединение | Источник выделения | Механизм индукции проницаемости | Ионная селективность и система тестирования | Ссылка |
|---|---|---|---|---|
| **Нейтральные ионофоры** | | | | |
| Авенациолид | | Электрогенный перенос, симпорт $A^-$ | $Ca^{2+} > Mg^{2+} > K^+$ (двуфазная система) | Truter, 1976; Harris, Wimhurst, 1973 |
| Боверицин | Beauveria bassiana | Электрогенный перенос | $Ca^{2+} > K^+ > Cs^+ > Li^+ > Na^+$ (двуфазная система) | Prince, Crofts, Steinrauf, 1974 |
| | Синтетический аналог | —"— | $Ba^{2+} > Ca^{2+} > Rb^+ = K^+ > Na^+ > Li^+$ (двуфазная система) | Roeske et al., 1974 |
| Нейтральный комплексон | Синтетический | —"— | $Ca^{2+} > Pb^+ > K^+ > Ba^{2+} > Cs^+ > Sr^{2+} > Na^+ > Li^+ > Mg^{2+}$ (электрод) | Amman et al., 1972 |
| Нейтральный комплексон | —"—"— | —"— | $Ca^{2+} > K^+ > H^+$ (митохондрии) | Caroni et al., 1977 |
| Диамидные лиганды | —"—"— | —"— | $Na^+ > K^+$; $Ca^{2+} > Sr^{2+} > Ba^{2+} > Mg^{2+}$ (комплексообразование) | Wun et al., 1977 |
| Дициклогексил-18-корона-6 | —"—"— | —"— | $Ag^+ > K^+ > Rb^+ > NH_4^+ > Cs^+ > Na^+ > Li^+$; $Ba^{2+} > Sr^{2+} > Ca^{2+} > Mg^{2+}$ (комплексообразование) | Pressman, 1976 |
| Дибутирил-дибензо-18-корона-6 | —"—"— | —"— | $Ca^{2+} > Mg^{2+} > H^+ > K^+ > Na^+$ (митохондрии) | Ташмухамедов и др., 1979 |

Продолжение таблицы 2

| Соединение | Источник выделения | Механизм индукции проницаемости | Ионная селективность и система тестирования | Ссылка |
|---|---|---|---|---|
| Гликопротеид | АТФаза митохондрий | Каналоформер | $Ca^{2+} > Sr^{2+} > Ba^{2+} > Mn^{2+} > Mg^{2+} > K^{+} > Na^{+}$ (БФМ) | Лукьяненко и др., 1980 |
| **Карбоксилатные ионофоры** | | | | |
| A 23187 | Streptomyces chartreusensis | $Me^{2+}$ / $H^{+}$-обмен | $Mg^{2+} > Ca^{2+} > Sr^{2+}$ (комплексообразование) | Caswell, Pressman, 1972 |
| | | | H; $Li^{+} > Na^{+} > K^{+}$; $Mn^{2+} > Ca^{2+} > Mg^{2+} > Sr^{2+} > Ba^{2+}$ (комплексообразование) | Pfeiffer, Lardy, 1976 |
| Лазалоцид A (X-537 A) | Streptomyces lasaliensis | $Me^{2+}$ /$H^{+}$-обмен, протонофор в высоких концентрациях | $H^{+} > Cs^{+} > Rb^{+} > K^{+} > Na^{+} > Li^{+}$; $Ba^{2+} > Ca^{2+} > Mn^{2+} > Sr^{2+} > Mg^{2+}$ (комплексообразование) | Celis et al., 1974<br>Patel, Shen, 1976 |
| Иономицин | Streptomyces conglobatus ATCC 31005 | $Me^{2+}$/$H^{+}$-обмен | $Ca^{2+} > Mg^{2+} > Sr^{2+} > Ba^{2+}$ (комплексообразование) | Liu, Hermann, 1978 |
| Антибиотик 6016 | Streptomyces sp. | $Me^{2+}$ /$H^{+}$-обмен | $NH_4^{+} = K^{+} > Rb^{+} = Na^{+} > Li^{+} = Cs^{+}$; $Mg^{2+} > Mn^{2+} = Ca^{2+} > Sr^{2+} = Ba^{2+}$ (комплексообразование) | Otake, Mitani, 1979 |
| Лизоциллин | Streptomyces cacaoi v. asoensis | $Me^{2+}$/$H^{+}$-обмен | $Rb^{+} > K^{+} > Na^{+} > NH_4^{+} > Li^{+} > Cs^{+}$; $Ba^{2+} > Mg^{2+} = Mn^{2+} > Sr^{2+} > Ca^{2+}$ (комплексообразование) | Mitani et al., 1977 |

| Соединение | Источник выделения | Механизм индукции проницаемости | Ионная селективность и система тестирования | Ссылка |
|---|---|---|---|---|
| Салиномицин | Streptomyces albus | $Me^{2+}/H^{+}$-обмен | $K^{+} > Rb^{+} > Na^{+} > Cs^{+} = Li^{+}$; $Mg^{2+} = Ca^{2+}$ (митохондрии) | Mitani et al., 1975, 1976 |
| Кальциформин | Внутренняя мембрана митохондрий сердца теленка | $Me^{2+}/H^{+}$-обмен | $Ca^{2+} > Sr^{2+} > Mn^{2+} > Mg^{2+}$ (комплексообразование) | Jeng et al., 1978 |
| Децил-2 | Синтетический циклопептид | $Me^{2+}/H^{+}$-обмен | $Ca^{2+} > Mg^{2+}$ (двуфазные системы) | Deber et al., 1978 |
| **Другие соединения—ионофоры двухвалентных катионов** | | | | |
| Виридотоксин | Aspergillus viridi-mutans | Предполагается, что атомы кислорода выстраиваются внутри мембраны и служат ионообменником для кальция | $Ca^{2+}$, $Mg^{2+}$ (комплексообразование) | Wong, Hamill, 1976 |
| Простагландины, $E_1$, | Предстательная железа | $Me^{2+}/H^{+}$-обмен | $Ca^{2+} > Sr^{2+} > Mg^{2+}$ | Kirtland, Baum, 1972; Carafoli, Crovetti 1973 |
| $B_2$, $E_2$ и водорастворимое производное $B_x$ | | | $Ca^{2+}$ (двуфазные системы) | Carstein, Muller, 1978; Ohnishi et al., 1979 |

Продолжение таблицы 2

| Соединение | Источник выделения | Механизм индукции проницаемости | Ионная селективность и система тестирования | Ссылка |
|---|---|---|---|---|
| Низкомолекулярный гидрофобный ионофор двухвалентных катионов | Митохондрии сердца, печени | $Me^{2+}/H^{+}$-обмен | $Ca^{2+}, Mg^{2+}$ (двуфазные системы) | Blondin, 1974 |
| | | | $Mg^{2+} > Ca^{2+} > K^{+}$ (митохондрии) | Махмудова и др., 1975 |
| Производные октадекадиеновых кислот (10 соединений): | Митохондрии сердца | Электрогенный перенос | $Ca^{2+} > Mg^{2+}$ | Blondin, 1975 |
| нейтральные V и VI | | $Me^{2+}/H^{+}$-обмен | $Ca^{2+} > Mg^{2+}$ | |
| карбоксил-содержащие соед. I—IV | | $Me^{+}/H^{+}$-обмен | $Na^{+}$ (двуфазные системы) | |

ретикулуме, вызывая утечку $Ca^{+2}$ наружу по концентрационному градиенту (Caswell, Pressman, 1972; Caroni et al., 1977). В интактном ретикулуме АТФ-зависимый $Ca^{2+}$-насос поддерживает примерно 1000-кратный градиент ионов $Ca^{2+}$. Энергетическая эффективность насоса характеризуется отношением $Ca^{2+}$/АТФ, равным 2 в оптимальных условиях (Бендолл, 1970).

Диацилпроизводные дибензо-18-короны-6 снижали величину $Ca^{+2}$/АТФ на СР с той же зависимостью от длины заместителей в боковых цепях, что и на митохондриях, т. е. наиболее активными были соединения 4а и 5.

Действующие концентрации циклополиэфиров в экспериментах на СР были в несколько раз выше по сравнению с таковыми на митохондриях. На рис. 6 показана концентрационная зависимость эффектов соединения 4а на величину $Ca^{2+}$/АТФ и АТФазную активность СР. Из представленных данных следует, что $Ca^{2+}$/АТФ уменьшается на 50% в присутствии 0,15—0,17 мМ соединения 3, с увеличением концентрации комплексона снижается АТФазная активность. Это торможение имеет неспецифический характер и отмечается даже в случае малоактивных производных 7 и 8.

Относительно низкая эффективность на СР исследованных производных дибензо-18-короны-6, по-видимому, обусловлена физико-химическими особенностями его мембран, в результате чего может сни-

жаться как коэффициент распределения ионофора в системе мембрана—вода, так и скорость его диффузии внутри мембраны.

Интересной особенностью соединения 4а является то, что его действие на Са-насос СР полностью предотвращается гидрофобным анионом тетрафенилборатом (ТБ), добавленным до ионофора (рис. 7, *в*). Эффект ТБ не проявляется при другой последовательности добавок (рис. 7, *б*). Аналогично ТБ действуют 2,4-динитрофенол и FCPR (*п*-трифторметоксифенилгидразон динитрила мезоксалевой кислоты). Влияние гидрофобных анионов не проявляется в случае А 23187 (рис. 7, *г*, *д*), с другой стороны, их присутствие в среде необходимо для реализации эффекта нейтрального кальциевого комплексона (Caroni et al., 1977). Сущест-

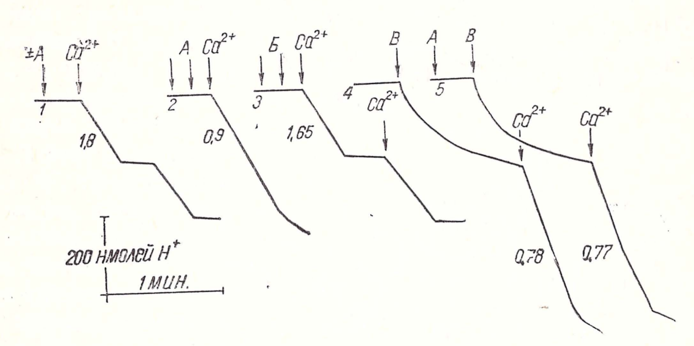



**Рис. 7. Влияние ТБ на индуцированное ионофорами снижение коэффициента $Ca^{2+}$/АТФ саркоплазматического ретикулума.**

Добавки: *А*—ТБ ($2\cdot10^{-6}$ *М*), *Б* — циклополиэфир 4а ($1{,}5\cdot10^{-4}$ *М*), *В*—ионофор А 23187 ($9\cdot10^{-8}$ *М*). Цифры у кривых—транспортное отношение $Ca^{2+}$ /АТФ.

вует несколько путей влияния ТБ на индуцированную проводимость мембран, в частности компенсация дипольной составляющей граничного скачка потенциала мембраны, титрование комплексов ионофор—катион в водном растворе, ведущее к ингибированию проводимости, нейтрализация положительного заряда комплекса в гидрофобной зоне мембраны, ускоряющая его диффузию (Овчинников и др., 1974; Caroni et al., 1977) и т. д. Эффект ТБ на ионофорную активность диацилпроизводных не может быть однозначно интерпретирован в рамках этих механизмов и требует дальнейших исследований.

Анализ ионофорных свойств производных бензо-15-короны-5 (Шкинёв и др., 1979а) показал, что алкильные производные, по сравнению с ацильными, обладают более высокой мембранной активностью. Амил- и гексаноилпроизводные этого циклополиэфира индуцируют проницаемость мембран митохондрий в основном для ионов $Na^+$. Относительно высокая селективность по $K^+$ отме-

чена у бензо-15-короны-5 и её валерил- и бутирилпроизводных. Гексаноилбензо-15-корона-5 промотирует также проницаемость по двухвалентным катионам, т. е. селективность его низка.

Среди ацилпроизводных бензо-18-короны-6 (Шкинёв и др., 1979 б) наиболее активными были пропионил- и валерилпроизводные, однако мембранные эффекты последнего малоспецифичны. В целом исследованные полиэфиры были в 15—20 раз менее активны, чем их симметричные аналоги (табл. 1). Эти различия, по-видимому, обусловлены изменениями электронной плотности на лигандных кислородах «полости» несимметричных бензо-15-короны-5 и бензо-18-короны-6 и связанной с этим нестабильной фиксацией катиона внутри ее.

Рис. 8. Формулы природных кальциевых ионофоров: X—537 A (лазалоцид) A, A 23187, авенациолида (по Truter, 1976).

Таким образом, представленные нами данные свидетельствуют, что некоторые из исследованных нами производных бензо-15-короны-5, бензо- и дибензо-18-короны-6 промотируют перенос одно- и двухвалентных катионов через мембраны митохондрий и саркоплазматического ретикулума и могут применяться в исследованиях транспортных систем этих органелл.

Другие нейтральные ионофоры, применяющиеся в биологических экспериментах, представлены в табл. 2.

**Авенациолид** представляет собой фунгицид (рис. 8). При действии на митохондрии он высвобождает $Ca^{2+}$ и незначительные количества $Mg^{2+}$, в модельных экспериментах показана его способность переносить $Ca^{2+}$, $Mg^{2+}$ и $K^{+}$ из водной фазы в органическую (Harris, Wimhurst, 1973, 1974).

**Боверицин,** относящийся к группе энниатиновых антибиотиков, но отличающийся наличием в своем составе остатков N-метил-L-фенилаланина (Hamill et al., 1969), в двуфазных системах связывает $Ca^{2+}$ (Prince et al., 1974). Нейтральные комплексоны, диамидные лиганды и гликопротеид из митохондриальной АТФазы используются в исследованиях Са-насосов клетки, а также в опытах по реконструкции $Ca^{2+}$-транспортирующих систем (Caroni et al., 1977; Bakker, 1979; Лукьяненко, 1980).

## КАРБОКСИЛАТНЫЕ ИОНОФОРЫ

В отличие от нейтральных, ионофоры карбоксилатного типа (табл. 2) характеризуются ациклическим строением и наличием терминального карбоксила (при связывании двухвалентного катиона ($Me^{2+}$) они образуют циклическую структуру с помощью $H^+$-связи между карбоксильной и спиртовой группами по типу «голова» к «хвосту»), диссоциирующего при нейтральных pH (Truter, 1976; Gomez-Puyou, Gomez-Lojero, 1977; Bakker, 1979). В природных и искусственных мембранах эти ионофоры катализируют электронейтральный обмен катионов на протоны (Bygrave, 1977).

**Лазалоцид А** с относительно низкой селективностью связывает и переносит одно- и двухвалентные катионы, а также биогенные амины, что определяет широкий спектр его биологических эффектов (Pressman, 1973; Schwartz, Entman, 1973; Kita, van der Kloot, 1974; Gomez-Puyou, Gomez-Lojero, 1977; Bakker, 1979).

**А 23187.** Фундаментальное отличие А 23187 от лазалоцида А заключается в том, что в его молекуле имеются 2 атома азота (Wong et al., 1973), участвующие в связывании катиона, что обусловливает высокую селективность по двухвалентным катионам (Pfeiffer, Deber, 1979), тогда как X 537 A не содержит в молекуле атомов азота (Johnson et al., 1970). Reed, Lardy, (1972) показали, что А 23187 проникает в мембрану митохондрий и функционирует как мобильный переносчик $Ca^{2+}$ и $Mg^{2+}$, выравнивая концентрационные градиенты этих катионов на мембране. Исследования процессов окислительного фосфорилирования и транспорта $Ca^{2+}$ в митохондриях показали (Wong et al., 1973), что эффекты ионофора в значительной мере зависят от присутствия в среде $Mg^{2+}$, комплексируемого значительно легче, чем $Ca^{2+}$. Этим и объясняется обращение эффекта ионофора при добавлении ионов $Mg^{2+}$. В биологических экспериментах А 23187 используется как $Ca^{2+}$-селективный ионофор, однако недавние сообщения Hovi et al., (1975) об экстракции им аминокислот в неполярную фазу, а также Flatman, Lew (1977) о способности промотировать транспорт $Na^+$ в эритроцитах указывают на необходимость более внимательного подхода при отнесении наблюдаемых биологических эффектов только как к следствию исключительно транспорта катионов.

По-видимому, эту задачу помогут разрешить ионофоры, более специфичные в отношении транспортируемых катионов. Использование антибиотика 6016, имеющего в своей структуре дополнительную OH-группу и углеводный остаток, что, по мнению Ogita et al. (1979), определяет его $Mg^{2+}$-специфичность, иономицина, селективность которого по $Ca^{2+}$ превышает таковую для А 23187, и синтетического $Ca^{2+}$-связывающего ионофора децил-2 (табл. 2), вероятно, позволит более однозначно интерпретировать биологические эффекты карбоксилатных ионофоров в целом.

Влияние приведенных в табл. 2 карбоксилатных ионофоров на метаболизм субклеточных компонентов, отдельных клеток, тканей и целых организмов детально обсуждено в ряде обзоров (Pressman, 1976; Bygrave, 1977; Bakker, 1979).

Кроме рассмотренных выше соединений, в литературе описана серия других потенциальных индукторов проницаемости мембран для двухвалентных катионов. В основном это соединения природного происхождения, однако их мембраноактивные свойства охарактеризованы недостаточно полно. Низкомолекулярный гидрофобный ионофор двухвалентных катионов из митохондрий, описанный в лабораториях Blondin (1974) и Ташмухамедова (Махмудова и др., 1975), по-видимому, является составной частью $Ca^{2+}$-транспортирующей системы этих органелл. Позднее Blondin (1975) подверг эту жирорастворимую мембранную фракцию фракционированию, в результате чего были идентифицированы 10 производных октадекадиеновых кислот с ионофорными свойствами (табл. 2). Однако эти исследования Blondin (1975) не нашли продолжения и не имеют резонанса в литературе.

Значительный интерес представляют мембраноактивные свойства простагландинов — высокоэффективных регуляторов клеточного метаболизма и $Ca^{2+}$-зависимых процессов. Существенно, что простагландины влияют на аккумуляцию $Ca^{2+}$ в изолированных митохондриях (Carafoli, Crovetti, 1973), по-видимому, стимулируя процесс обмена $H^+/Ca^{2+}$. В связи с этим необходимо отметить структурное сходство простагландинов и выделенных из митохондрий производных октадекадиеновых кислот.

## ПРИМЕНЕНИЕ ИОНОФОРОВ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

В настоящее время соединения с ионофорными свойствами находят широкое применение как в биологии, так и при решении некоторых прикладных задач, связанных с проблемами медицины, сельского хозяйства и некоторых технологических процессов. В частности, с применением ионофоров были оценены важные качественные и количественные параметры функционирования мембран (Овчинников и др., 1974), исследованы основные постулаты хемиосмотической теории Митчела (Скулачев, 1972). Рассматривая прикладные аспекты использования ионофоров, прежде всего следует отметить фармакологические эффекты лазалоцида А и А 23187 (Pressman, 1973, 1976; Bygrave, 1977; Bakker, 1979), применение ионофоров в качестве активных компонентов ионселективных электродов (Scholer, Simon, 1970; Rechnitz, Eyal, 1971; LeBlanc Yr., Grubb, 1976), или биодеградируемых селективных пестицидов с низкой токсичностью для теплокровных (Ando, Nawata, 1978).

Синтетические ионофоры — макроциклические полиэфиры, в отличие от ионофоров микробного происхождения, характери-

зуются относительно высокими эффективными концентрациями и другими свойствами, неблагоприятными для мембранной активности, в связи с чем в биологических экспериментах соединения этого типа поначалу использовались ограниченно (Tosteson, 1968; Lardy ,1968; Estrada-O, Carabéz, 1972). Основное применение им было найдено в химии и технике (Овчинников и др., 1974). Так, с помощью полимерных производных бензо-18-короны-6 получены перспективные твердые и жидкие комплексоны-ионообменники, сочетающие в себе свойства катионитов и анионитов (Wong et al., 1974). Макроциклические полиэфиры используются в настоящее время для экстракции некоторых металлов, активации анионов в реакциях органического синтеза, перевода солей металлов в органическую фазу, стабилизации необычных состояний окисления и т. д. (Овчинников, 1978).

К настоящему времени сфера применения синтетических макроциклических соединений значительно расширилась. Получены так называемые криптанды, способные переводить в водную или органическую фазу труднорастворимые соли некоторых металлов, связывать анионы и другие молекулы, а также катионы переходных и тяжелых металлов. Лиганды этого типа представляют значительный интерес как агенты, пригодные для регуляции уровня токсических катионов в биосфере (Овчинников, 1978). Представитель краун-эфиров — 24-корона-8 примерно в 200 раз увеличивает растворимость радиоактивного стронция в органической фазе, что позволяет с помощью этого циклополиэфира удалять до 99,9% $^{90}Sr$ из ядерных отходов (Gerow, Davis, 1978).

Чехословацкие исследователи разработали серию мембранных электродов на основе макроциклических полиэфиров с 18- и 30-членным кольцом, которые обладают K/Na-избирательностью ниже, чем электроды с валиномицином, но тем не менее могут применяться на практике благодаря ряду специфических свойств (Petranek, Ruba, 1974). Способность макроциклических полиэфиров связывать катионы органических аминов используется также в энзимологических и мембранологических исследованиях (Cram, Cram, 1974; Izatt et al., 1978).

Относительно простые по сравнению с природными комплексонами синтетические соединения с ионофорными свойствами успешно применяются в ряде лабораторий для анализа взаимосвязи экстракционной или мембранной активности и особенностей химической структуры. Использовав этот подход для «проектирования» молекул макроциклических полиэфиров, Крам и др. (1975) синтезировали оптимальные по строению макроциклы, позволившие осуществить полное разделение энантиомеров рацемических смесей аминокислот методом жидкостной хроматографии. Интересным с точки зрения анализа структурно-функциональных свойств явилось также комплексное исследование ацильных, алкильных и α-оксиалкильных производных бензо-15-короны-5, бензо- и дибензо-18-короны-6, дибензо-24-короны-8 и дибензо-30-короны-10

(Ташмухамедов и др., 1978; 1979; Tashmukhamedov et al., 1980), выполненное в нашей лаборатории. В результате были идентифицированы соединения, обладающие свойствами ионофоров, селективных по одно- и двухвалентным катионам на биологических мембранах и модельных системах.

## ЛИТЕРАТУРА


Бендолл Дж. «Мышцы, молекулы, движение». 1970, М.

Борисова М. П. 1979. «Свойства ионных каналов, образуемых полиеновыми антибиотиками». Автореф. канд. дисс., М.

Крам Д. Дж. и др. 1975. «Химия гетероциклич. соед.» **10**, 1299.

Лев А. А. 1976. Моделирование ионной избирательности клеточных мембран.. Л.

Лукьяненко А. И., Берестовский Г. Н., Евтодиенко Ю. А. 1980. «Биофизика», **25**, I, 82.

Махмудова Э. М. и др. 1975. «Биофизика», **20**, 225.

Михалева И. И. и др. 1968. «Журн. общей химии», **38**, 1229.

Овчинников Ю. А., Иванов В. Т., Шкроб А. М. 1974. Мембраноактивные комплексоны. М.

Овчинников Ю. А. 1978. В кн.: «Итоги и перспективы развития биоорганической химии и молекулярной биологии», 128.

Прессман Б. К. 1978. В кн.: «Неорганическая биохимия», т. 1, 246.

Скулачев В. П. 1972. Трансформация энергии в биомембранах. М.

Ташмухамедов Б. А. и др. «Биоорган. химия», **5**, 429.

Ташмухамедов Б. А. и др. Авт. свидет. 1978. 2609466/23—04.

Ташмухамедова А. К. и др. 1978а. «Биоорган. химия», **4**, 806.

Ташмухамедова А. К. и др. 1978б. «Биоорган. химия», **4**, 1232.

Шкинёв А. В. и др. 1979а. ХПС, **2**, 242.

Шкинёв А. В., Гагельганс А. И., Ташмухамедова А. К. 1979б. ХПС, **2**, 243.

Ammann D., Pretsch E., Simon W. 1972. Tetrahedron Lett., 2473.

Ando K. A., Nawata Y. 1978. In «Mater. of $2^{nd}$ Int. Symp. on Macrocycl. comp. Brigham Y. Univ., USA, 1, 48.

Bakker E. P. 1979. Antibiotics, **5**, p. 1, 67.

Bean R. C. 1972., In «Membranes. A. Series of Advances» (Eisenman G., ed.). **2**, 409.

Beck J. et al. 1962. Helv. Chim. acta, **45**, 620.

Benz R. et al. 1973. J. Membrane Biol., **14**, 339.

Blondin G. A. 1974. Biochem. Biophys. Res. Commun., **56**, 97.

Blondin G. A. 1975. Ann. N. Y. Acad. Sci., **264**, 98.

Brierley G. P. 1974. Ann. N. Y. Acad. Sci., **227**, 398.

Brockmann H., Schmidt-Kastner G. 1955. Chem. Ber., **88**, 5, 57.

Bygrave F. L. 1977. Curr. Top. Bioenerget., **6**, 259.

Carafoli E., Crovetti F. 1973. Arch. Biochem. and Biophys., **154**, 1, 40.

Caroni P. et al. 1977. Biochim. Biophys. acta **470**, 437.

Carstein M. E., Muller J. D 1978. Arch. Biochem. and Biophys., **185**, 1, 282

Caswell A. H., Pressman B. C. 1972. Biochem. and Biophys.. Res. Communs, **49**, 292.

Celis H., Estrada-O S., Montal M. 1974. J. Membr. Biol., **18**, 188.

Chaney M. O. et al. 1974. J. Amer. Chem. Soc., **96**, 1932.

Christensen J. J., Delbert I. E., Izatt R. M. 1974. Chem. Rev., **74**, 8, 351.

Cram D. J., Cram J. M. 1974. Science, **183**, 803.

Deber C. M., Adawadkar P. D., Tom-Kun J. 1978, Biochem. Biophys. Res. Communs, **81**, 4, 1357.

Eisenman G., Krashe S., Ciani S. 1976. In «Ion Selective and Enzyme Electrodes in Medicine and Biology». Kessler M., Clark L., Lübbers P.,

Silver I., Simon W. (Eds.). Münich—Vienna: Urban and Schwarzenberg, 3.
Eisenberg M., Hall. J. E., Mead C. A. 1973. J. Membrane Biol., **14**, 143.
Estrada—O. S., Cárabez A. 1972. J. Bioenerg., **3**, 429.
Finkelstein A. 1970. Biochim. Biophys. Acta, **205**, **1**.
Finkelstein A., Cass A. 1968. J. Gen. Physiol., **52**, **1455**.
Flatman P. Lew V. L. Nature, **270**, 5636, 444.
Gäumann E. et al. 1947. Experientia, **3**, 202.
Gerow I. H., Davis M. W. 1978. In: «Second Symp. Macr. Comp.» Aug., 1, 3, 9.
Gomez-Puyou A., Gomez-Lojero C. 1977. Current. Top. Bioenerg., **6**, 221.
Gordon L. G. M., Haydon D. A. 1972. Biochim. Biophys. acta, **255**, 1014.
Graven S. N. et al. 1966. Biochemistry, **5**, 1729.
Hamill R. L. et al. 1969. Tetrahedron Letters, 4255.
Harris E. J., Wimhurst J. M. 1973. Nature New Biol., **245**, 271.
Harris E. J., Wimhurst J. M. 1974. Arch. Biochem. and Biophys., **162**, 426.
Harris E. J. et al. 1977. Arch. Biochem. Biophys. **182**, 311.
Hovi T., Williams S. C., Allison A. C. 1975. Nature, **256**, 70.
Izatt R. M. et al. 1978. Science, **199**, 4332, 994.
Jeng A. Y., Ryan T. E., Shamoo A. E. 1978. Proc. Nat. Acad. Sci. USA **75**, 5, 2125.
Johnson S. M., Herrin J., Liu S. J., Paul I. C. 1970. J. Amer. Chem. Soc., **92**, 4428.
Kilbourn B. T. et al. 1967. J. Mol. Biol., **30**, 599.
Kirtland S. J., Baum H. 1972. Nature New Biol., **236**, 63, 47.
Kita H., van der Kloot W. 1974. Federat. Proc., **33**, 3, p. 1, 449.
Lardy H. A. 1968. Federat. Proc., **27**, 1278.
LeBlanc O. H. Yr., Grubb W. T. 1976. Anal. Chem., **48**, 12, 1658.
Liu C.—M., Hermann T. E. 1978. J. Biol. Chem., **253**, 17, 5892.
Maier S. J., Paul I. C. 1971. Chem. Comm., 181.
Malmström K., Carafoli E. 1975. Arch. Biochem. and Biophys., **171**, 418.
Meyers E. et al. J. Antibiot., **18**, 128.
McMurray W., Begg R. M. 1959. Arch. Biochem. and Biophys., **84**, 546.
Mitani M., Yamanishi T., Miyazaki Y. 1975. Biochem. Biophys. Res. Comm., **66**, 4, 1231.
Mitani M. et al. 1976. Antimicrob. Agents and Chemother., **9**, 4, 655.
Mitani M. et al. 1977. J. Antibiot., **30**, 186.
Mitchell P. 1968. Chemiosmotic coupling and energy transduction. Glinn. Research., Bodmin. Cornwall.
Moore C., Pressman B. C. 1964. Biochem. Biophys, Res, Comm., **15**, 562.
Mueller R. V., Finkelstien A. 1972. J. Gen. Physiol., **60**, 263.
Mueller P., Rudin D. O. 1968. Nature, **217**, 713.
Nawata Y., Sakagami T., Iitaka Y. 1975. Chem. Lett., 151.
Ogita T. et al. 1979. Agric. and Biol. Chem., **43**, 7, 1537.
Ohnishi S. T., Devlin T. M. 1979. Biochem. Biophys. Res. Commun., **89**, 1, 240.
Oishi H. et al. 1970. J. Antibiot., **23**, 105.
Patel D. J., Shen C. 1976. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **73**, 6, 1786.
Pedersen C. J. 1967. J. Amer. Chem. Soc., **89**, 7017.
Pedersen C. J. 1970. J. Amer. Chem. Soc., **92**, 386.
Petranek I., Ruba O. 1974. Analyt. Chim. Acta, **72**, 2, 375.
Pfeiffer D. R., Deber C. M. 1979. FEBS Lett., **105**, 2 360.
Pfeiffer D. R., Lardy H. A. 1976. Biochemistry, **15**, 935.
Pinkerton M., Steinrauf L. K., Dawkins P. 1969, **35**, 512.
Plattner Pl. A., Nager U. 1948 **BH**, Heln. Chim. Acta, **31**, 2203.
Pressman B. C. Biological Application of Ionophores. Palo Alto, Calif.
Pressman B. C. 1973. In: «Inorganic Biochemistry. Eichhorn (Ed.)», 203.
Prince R. C., Crofts A. R., Steinrauf L. K. 1974. Biochem. Biophys. Res. Commun., **59**, 2, 697.
Rechnitz G. A., Eyal. E. 1971. Analyt. Chem., **43**, 1090.
Reed P. W., Lardy H. A. 1972. J. Biol. Chem., **247**, 6970.
Roeske R. W. et al. 1974. Biochem. Biophys. Res. Commun., **57**, 554.

Scholer R. P., Simon W. 1970. Chimia, **24**, 372.
Schwartz A., Entman M. L., 1973. Abstr. Symp. Calcium Bind. Prot., Yablonna near Warsaw, Warsaw e. a., 26.
Shamoo A., Goldstein D. A. 1977. Biochim. Biophys. Acta, **472**, 13.
Shemyakin M. M. et al. 1969. J. Membr. Biol., **1**, 402.
Tashmukhamedov B. A. et al. 1980. Frontiers of Bioorgan. Chem. and Molec. biol., Pergamon Press, Oxford a. N. Y., 439.
Tosteson D. C. 1968. Federat. Proc., **27**, 1269.
Tosteson D .C. et. al. 1968, J. Gen. Physiol., **51**, 3735.
Truter M. R. 1976. In: «Calcium in Biol. Syst. 30 Symp. Soc. Exptl. Biol. Enfelgield Green, 9—10 Sept. 1975, Cambridge e. a., Cambr. Univ. Press, VIII, 19.
Wong D. T., Hamill R. L. 1976. Biochem. Biophys. Res. Communs, **71**, 332.
Wong D. T. et al. 1973. Arch. Biochem. Biophys., **156**, 578.
Wond K. H., Yagi K., Smid J. 1974. J. Membr. Biol., **18**, 379.
Wun T.-C., Bittman R. 1977. Biochemistry, **16**, 2080.
Wun T.-C., Biottman R., Borowitz I. J. Biochemistry, 1977, **16**, 2074.

О. В. КРАСИЛЬНИКОВ

# ДЕЙСТВИЕ ЦИТОТОКСИНА И ФОСФОЛИПАЗЫ А ЯДА СРЕДНЕАЗИАТСКОЙ КОБРЫ НА ЕСТЕСТВЕННЫЕ И ИСКУССТВЕННЫЕ МЕМБРАНЫ

Исследования ядов змей семейства элапидов, связанные с выделением в чистом виде составляющих эти яды веществ, биологическим тестированием их и изучением особенностей действия, показали, что большинство биологических эффектов ядов элапидов реализуется на уровне мембран. В составе ядов, помимо нейротоксинов, специфически модифицирующих свойства постсинаптических мембран, обнаружены вещества, непосредственно действующие на фосфолипидный остов мембран: фосфолипаза А и компоненты яда, известные в литературе под названием «мембраноактивные полипептиды» (Condrea, 1974), которые потенцируют деструктивное действие фосфолипазы А на мембранные фосфолипиды. В синергичном взаимодействии мембраноактивные полипептиды и фосфолипаза А разрушают практически любые биологические мембраны и, таким образом, действуют токсически, вызывая разнообразные биологические эффекты, среди которых наиболее исследованы гемолиз и кардио-цитотоксическое действие. Благодаря этому, мембраноактивные полипептиды описаны в литературе под различными тривиальными названиями (прямые гемолизины; кардиотоксины; факторы, деполяризующие скелетные мышцы; гемоцитокардиотоксины), в том числе и как цитотоксины — ЦТ.

Фосфолипаза А и ЦТ образуют в ядах элапидов мощную систему «структурных», или «мембранных», токсинов деструктивного действия. Глубокий анализ свойств и особенностей действия на мембраны составляющих эту систему компонентов, взятых в отдельности или совместно, важен не только для понимания меха-

низма токсического действия цельных ядов, но и в связи с возможностью использования этих веществ в практике научных исследований в качестве инструментов изучения структуры и функции биологических мембран.

Фосфолипаза А и ЦТ выделены в чистом виде из ядов различных кобр, в том числе из яда среднеазиатской кобры Naja oxiana Eichwald (Сахибов и др., 1970; Юкельсон и др., 1974). Однако особенности действия ЦТ и фосфолипазы А на биологические мембраны исследованы недостаточно. В последнее время при изучении механизма действия некоторых физиологически активных веществ, например антибиотиков, широко используются модели биологических мембран — искусственные фосфолипидные мембраны (ИФМ) (Овчинников и др., 1974; Лев, 1975). В литературе нет данных о действии ЦТ и фосфолипазы А ядов элапидов на ИФМ. Между тем, сопоставление эффектов этих компонентов на биологических мембранах и ИФМ представляется весьма целесообразным.

Фосфолипаза А и ЦТ выделены из яда среднеазиатской кобры Naja oxiana Eichwald, полученного из фрунзенского зоокомбината. Чистоту препаратов фосфолипазы А и ЦТ (шифр $V''_c$ 5) определяли горизонтальным и дисковым электрофорезом, рехроматографией, анализом N- и С-концевых аминокислот. Молекулярный вес фосфолипазы А 12843, ЦТ — 6631. Следует отметить вариации удельной активности компонентов в зависимости от партии яда.

Общие фосфолипиды мозга быка и эритроцитов различных видов животных получали по методу Фолча—Мюллера (Folch et al., 1957; Mueller et al., 1963). Холестерин производства Ленинградского мясокомбината окисляли по методу Тин (Tien et al., 1966). В работе использовали яичный лецитин фирмы Merck (ФРГ) и производства Олайнского завода; чистый лецитин получали из яичных желтков по Сингельтону (Singelton et al., 1965). Чистоту полученных липидов проверяли тонкослойной хроматографией на силикагеле в системах растворителей: 1) хлороформ: метанол: аммиак; 2) хлороформ: метанол: уксусная кислота: вода; 3) хлороформ: метанол: вода. Остальные реактивы имели квалификацию «ХЧ» и «ЧДА».

Фосфолипидные монослои получали нанесением раствора яичного лецитина в гептане на субфазу, содержащую исследуемые компоненты. Плотность монослоя регулировали нанесением на субфазу различного количества фосфолипидов в постоянном объеме гептана. Поверхностное натяжение измеряли методом отрыва платинового кольца (Гаркинс, 1950), соединенного с торсионными весами. Стеклянную измерительную ячейку термостатировали при 37°С.

Для определения поверхностной активности материала 25 мл раствора исследуемого вещества, взятого в определенной концентрации в трис-буфере (0,5—5,0 мМ), вносили в измерительную термостатированную ячейку. Поверхностное натяжение измеряли

через каждые 30 мин в течение 3—4 ч. Величина ошибки ±1 дин/см.

Для получения плоских «черных» фосфолипидных мембран (ИФМ) раствор общих фосфолипидов высушивали в вакууме и растворяли в декане (50 мг/мл). ИФМ формировали методом пузырька на отверстии тейлонового стаканчика, помещенного в стеклянную ячейку с солевым раствором. Процесс образования «черных» мембран наблюдали в отраженном свете. Для измерения электропроводности ИФМ применяли обычную электрическую схему (Либерман, 1970). Заряженные бислойные мембраны получали по методу Корепановой (1975).

Взаимодействие двух ИФМ исследовали методом Либермана и Ненашева (1970). Раствор фосфолипидов в декане наносили на отверстие тефлоновых стаканчиков с плоской стенкой, полученные липидно-декановые пленки раздували до полусфер. Через 20 с образующиеся «цветные» мембраны приводились в соприкосновение на постоянной площади, одновременно включали секундомер. Исследовали слипание только «цветных» мембран, это явление фиксировали визуально в проходящем свете.

Для определения гемолитической активности использовали свежую кровь, стабилизированную консервантом 7б. Эритроциты отмывали трижды 5—6-кратным объемом изотонического раствора (150 мМ NaCl или 300 мМ сахарозы в 5 мМ трис-буфере, pH 7,5). К объему 50% суспензии клеток прибавляли объем раствора, содержащего исследуемое вещество, смесь перемешивали и термостатировали. Количество освобожденного гемоглобина определяли спектрофотометрически по поглощению при 540 нм. Количество гемоглобина, соответствующее полному лизису эритроцитов, определяли после осмотического гидролиза. Трипсинизацию (240 мкг/мл) проводили в течение 30 мин с последующей 3-кратной отмывкой клеток 10 объемами изотонического раствора.

Электрофорез клеток проводили в специальной ячейке, выполненной на основе камеры Горяева, при комнатной температуре. Перед определением дзета-потенциала отмытые эритроциты ($10^6$ клеток/мл) инкубировали 30 мин с различными концентрациями $Ca^{2+}$ и (или) ЦТ. Электрокинетический потенциал клеток при градиенте потенциала 3 В/см рассчитывали по формуле Смолуховского:

$$\zeta = \frac{4\pi V \eta}{ДE},$$

где $\eta$ — коэффициент вязкости среды;
$V$ — скорость передвижения клеток;
Д — диэлектрическая проницаемость среды;
$E$ — градиент потенциала.

Иодирование белков осуществляли в глициновом буфере (pH 9,0) по Condrea et al. (1965).

Для получения нагруженных ионами калия липосом 15 мг сухих фосфолипидов диспергировали в 1 мл раствора KCl (150 мМ

KCl, 5 мМ трис-HCl, pH 7,5). Для освобождения от наружного KCl полученные многослойные липосомы пропускали через колонку с сефадексом G=25, уравновешенную 150 мМ NaCl, 5 мМ трис-HCl, pH 7,5 (среда 1).

Для регистрации выхода калия аликвоту липосом или отмытых средой 1 эритроцитов вносили в термостатированную ячейку, содержащую 2 мл такой же среды. Регистрацию осуществляли с помощью самодельного валиномицинового электрода на pH-метре ЛПУ-01 с подключенным к нему самописцем, шкалу которого калибровали методом стандартных добавок. В качестве электрода

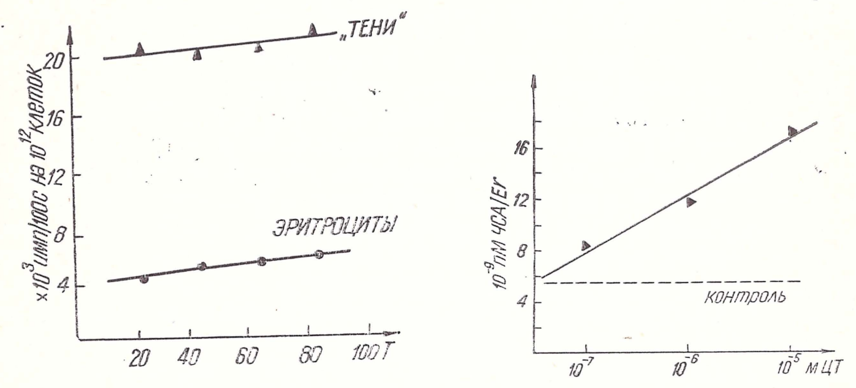



Рис. 1. Связывание $^{131}$I-ЦТ с мембранами эритроцитов человека. Использовалась 50% суспензия эритроцитов в физиологическом растворе NaCl; концентрация $^{131}$I-ЦТ$=2\cdot10^{-5}$ М.

Рис. 2. Активация цитотоксином связывания I-ЧСА с мембранами эритроцитов человека. Количество связавшегося I-ЧСА определяли активационным анализом.

сравнения использовали хлорсеребряные электроды ЭВЛ-1МЗ, сообщающиеся через агаровый мостик с измерительной ячейкой. Целостность мембран эритроцитов регистрировали по светорассеянию суспензии (530 нм) под углом 90° ФЭУ-20, связанным с pH-метром, к выходу которого подключен самописец.

Множественность и разнообразие биологических эффектов цитотоксина (Юкельсон и др., 1973, 1974) позволяют предположить, что в основе этих эффектов лежит взаимодействие ЦТ с мембранами. Прямые доказательства этого получены нами с помощью меченого $^{131}$I-ЦТ (0,25 мкКюри/мг). На суспензии трижды отмытых физиологическим раствором и затем обработанных $^{131}$I-ЦТ эритроцитов человека установлено, что $^{131}$I-ЦТ связывается с интактными клетками, однако в меньшей степени, чем с «тенями» (рис. 1). Такие же данные получены Condrea et al. (1956), использовавшими $^{131}$I-ЦТ из яда кобры H. haemachates.

Все цитотоксические полипептиды яда элапидов способны потенцировать действие на мембраны кислых фосфолипаз А яда,

которые сами по себе на мембраны (или мембранные фосфолипиды) действуют слабо (Lee, 1972; Condrea, 1974). По-видимому, это обусловлено участием цитотоксинов в связывании фосфолипаз А с отрицательно заряженными цитоплазматическими мембранами. Для проверки этого предположения мы исследовали связывание I-меченого сывороточного альбумина человека (I-ЧСА) с изоэлектрической точкой (pI) 4,8, который в наших опытах моделировал кислую фосфолипазу А с pI 5,1, на предварительно обработанных ЦТ эритроцитах человека (рис. 2). Результаты показывают, что связывание мембранами кислых белков действительно стимулируется ЦТ.

Причиной такого эффекта цитотоксинов могут быть особенности их химического строения: все они являются полипептидами с сильно выраженными основными свойствами (Lee, 1972; Юкельсон и др., 1973, 1974; Condrea, 1974; Crishin et al., 1974). Следует ожидать, что ЦТ должен вызвать уменьшение электроотрицательности поверхности клеточных мембран. Действительно, мы определили, что при электрофорезе эритроцитов в присутствии ЦТ скорость миграции клеток к аноду уменьшается, более того, появляются клетки, мигрирующие в обратном направлении — «ревертанты». Адсорбция на плазматической мембране ЦТ начиная с $1 \times 10^{-7}$ М сопровождается не только снижением, но и реверсией электрокинетического потенциала эритроцитов. При этом не наблюдается синхронного изменения потенциала поверхности всех клеток: отмечается присутствие клеток как с пониженным, так и с ревертированным дзэта-потенциалом. Возможно, это связано с различной адсорбцией ЦТ в гетерогенной популяции эритроцитов. Не исключено, что резертанты представлены «тенями» эритроцитов, связывающими, как показывают наши опыты, ЦТ более интенсивно, чем интактные клетки. В отличие от ЦТ, ионы кальция, хотя и снижали электрокинетический потенциал эритроцитов, но не способствовали появлению клеток-ревертантов; при совместном введении ЦТ и $Ca^{2+}$ влияние ЦТ на дзета-потенциал поверхности мембран тормозилось.

Способность ЦТ изменять поверхностный заряд мембраны подтверждена нами в опытах на модельной системе при исследовании «слипания» двух полусфер цветных ИФМ. С увеличением концентрации ЦТ уменьшается время их слипания. Аналогично влияют на слипание ИФМ ионы кальция (рис. 3).

Максимальное время слипания ИФМ отмечено при pH 6,0—6,5 (рис. 4). Эти результаты в отношении эффекта $Ca^{2+}$ коррелируют с данными литературы (Либерман, Ненашев, 1970), могут быть интерпретированы как влияние ЦТ на поверхностный потенциал мембраны и подтверждают электростатический характер происходящего при этом взаимодействия.

Таким образом, полученные нами данные показывают, что ЦТ адсорбируется на мембране, вызывая изменение поверхностного заряда мембраны, и одновременно облегчает связывание на ней

кислых фосфолипаз А, которые сами по себе вследствие электростатического отталкивания слабо взаимодействуют с мембранами.

Особенностью химического строения всех цитотоксинов из ядов элапидов является сочетание в их молекулах электроположительного заряда высокой плотности с гидрофобными свойствами. Наличие гидрофобных свойств постулируется на основании изучения строения ЦТ, выявившего высокое содержание в их молекулах неполярных аминокислот (Lee 1972; Condrea, 1974; Grishin et al., 1974). В связи с этим представляло интерес оценить гидрофобные свойства ЦТ в эксперименте измерением его поверхностной активности (ПА) на границе раздела вода — воздух и в фосфоли-

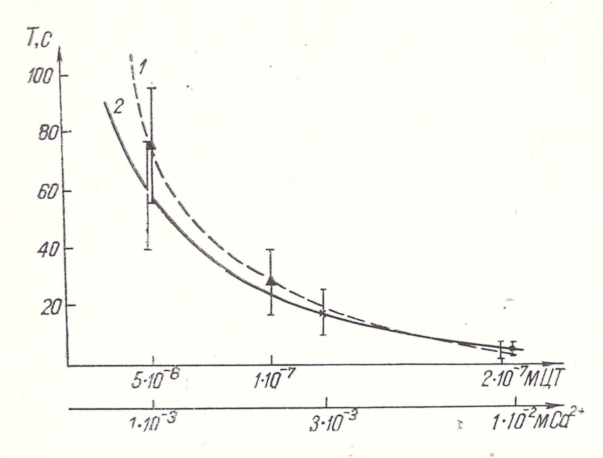



Рис. 3. Влияние ЦТ и $Ca^{2+}$ на время слипания ИФМ. Среда: 5 мМ трис-HCl, pH-7,4; при исследовании ЦТ в среде присутствует 1 мМ ЭДТА.

*1*—ЦТ; *2*—$Ca^{2+}$.

пидных монослоях. В наших экспериментах установлено (рис. 5), что уже в концентрации $4{,}3 \cdot 10^{-7}$ М цитотоксин снижает поверхностное натяжение (ПН) 0,5 мМ трис-буфера (pH 7,4) с 70 до 55 дин/см; увеличение концентрации полипептида не приводило к дальнейшему уменьшению ПН. Бычий сывороточный альбумин (БСА) максимально снижал ПН до 50 дин/см, но лишь в концентрации выше $2 \cdot 10^{-5}$ М. Таким образом, максимальное изменение ПН, вызываемое БСА, в количественном выражении на 5 дин/см больше, чем в случае ЦТ. Вероятно, именно это послужило основанием для отрицания выраженной ПА у цитотоксинов (Vogt, 1970). Однако эта «большая» ПА БСА становится кажущейся при ее оценке по отношению наибольшего понижения ПН (σ, дин/см) к той наименьшей концентрации, при которой оно достигается ($C_{min}$, М/см³), т. е. в гиббсах (Нейман и др., 1972). Эта величина для ЦТ составила $3 \cdot 10^{10}$, для БСА — только $9 \cdot 10^{8}$, а

для мелиттина, важность ПА которого в механизме действия признается всеми исследователями,— $2{,}6 \cdot 10^{10}$ гиббс.

Наличие выраженной ПА у ЦТ позволило предположить, что он может внедряться в гидрофобные области биологических мембран. Для проверки такой возможности мы исследовали влияние ЦТ на монослои яичного лецитина фирмы Merck с поверхностным давлением 28 дин/см при pH 6,0, что примерно соответствует величине площади, приходящейся на одну молекулу фосфолипида

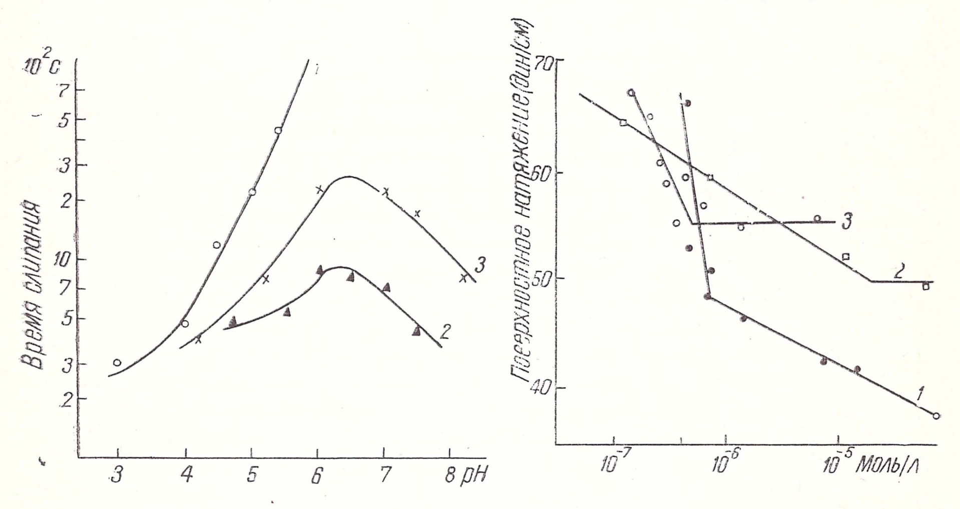



Рис. 4. Влияние ЦТ и ионов $Ca^{2+}$ на время слипания ИФМ.

*1*—контроль; *2*—$2 \cdot 10^{-7}$ М ЦТ; *3*—$1 \cdot 10^{-4}$ М $Ca^{2+}$ (Либерман, Ненашев, 1970).

Рис. 5. Поверхностная активность мелиттина (*1*), бычьего сывороточного альбумина (*2*) и цитотоксина (*3*). Среда: 0,5 мМ трис-HCl, pH-7,4; 37°С.

в естественных мембранах (Бабаков и др., 1972). В такой системе ЦТ ($1 \cdot 10^{-6}$ М) значительно снижал ПН монослоев, причем эффект рос с увеличением pH субфазы; аналогично действовали на монослой ионы кальция ($1 \cdot 10^{-4}$ М) (рис. 6).

Взаимодействие ЦТ с монослоями достаточно высокого поверхностного давления позволяет предполагать, что он может вызывать усиление проницаемости ионов через гидрофобную область мембран. В литературе имеются косвенные данные, подтверждающие это предположение (Lee, 1972; Chang et al., 1972). Мы установили, что ЦТ (2 мкг/мл), действительно, значительно усиливает пассивный выход $K^+$ из эритроцитов, суспендированных в физиологическом растворе NaCl, инициирует набухание клеток без их гемолиза и лишь при дальнейшем увеличении концентрации токсина происходит лизис клеток (рис. 7). Аналогичный эффект ЦТ выявлен на ИФМ. Установлено, что с увеличением концентрации ЦТ снижается сопротивление ИФМ и их стабильность (рис. 8).

Эффект ЦТ на проводимость ИМФ растет с увеличением pH среды (рис. 9).

Имелись противоречивые сведения о селективности модифицированных ЦТ ИФМ (Юкельсон и др., 1974; Ксенжек и др., 1978). Мы установили, что селективность таких мембран сильно зависит от pH среды (рис. 10). При pH$\leqslant$4,0 селективность только анионная, поскольку практически полностью протонированы его карбоксильные группы. В пределах pH 5,0—8,0 ИФМ могут обладать как анионной, так и катионной селективностью. Это, возможно,

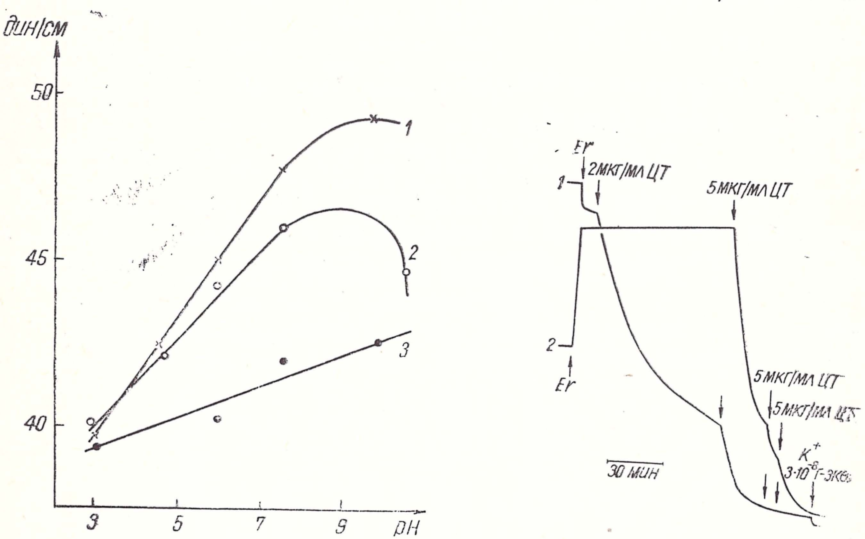



Рис. 6. Влияние ЦТ и ионов $Ca^{2+}$ на зависимость поверхностного натяжения фосфолипидных монослоев от pH субфазы.

*1*—контроль, *2*—$1\cdot10^{-4}$ М $Ca^{2+}$, *3*—$1\cdot10^{-6}$ М ЦТ.

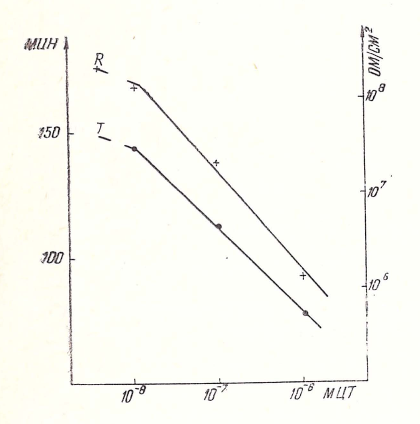
Рис. 7. Влияние ЦТ на набухание (*2*) и выход $K^+$ (*1*) из эритроцитов человека. Среда: 150 мМ NaCl, 5 мМ трис-HCl, pH 7,5. $E_{750}$ суспензии-0,07.

обусловлено появлением и количественным увеличением ионизированных карбоксильных групп токсина. С ростом величины pH вклад этих групп ЦТ в селективность ИФМ становится преобладающим, хотя суммарный заряд молекулы токсина во всем исследованном диапазоне pH положителен (pI$\geqslant$10) (Salach et al., 1971). По-видимому, не молекулы фосфолипидов и не общий заряд молекулы ЦТ, а лишь часть его ионизированных групп определяет селективность модифицированных им ИФМ. Используя методику фиксации потенциала, мы установили, что в присутствии ЦТ можно наблюдать флуктуации проводимости дискретной, но различной амплитуды. Пример таких флуктаций тока представлен на рис. 11.

В связи с фактом синергизма ЦТ и фосфолипазы А на естественных мембранах представляло интерес исследовать их совместное действие на ИФМ.

| *Вариант* | *Минуты* | $ом^{-1} \cdot см^{-2} \cdot 10^{-9}$ |
|---|---|---|
| 1. Контроль | 150 | 3,3 |
| 2. $7{,}7 \cdot 10^{-7}$ М Фл-А | 102 | 1,75 |
| 3. $3{,}85 \cdot 10^{-6}$ М Фл-А | 27 | 4,45 |
| 4. $3{,}85 \cdot 10^{-6}$ М Фл-А$+1 \cdot 10^{-7}$ М ЦТ | 11 | 30 |
| 5. $1 \cdot 10^{-7}$ М ЦТ | 110 | 33 |
| 6. $3{,}85 \cdot 10^{-6}$ М Фл-А$+4 \cdot 10^{-3}$ М $Ca^{2+}$ | 50 | 8.3 |
| 7. $3{,}85 \cdot 10^{-6}$ М Фл-А$+1 \cdot 10^{-7}$ М ЦТ$+$ $+4 \cdot 10^{-3}$ М $Ca^{2+}$ | 21 | 18 |

ЦТ существенно не изменяет среднего времени жизни ИФМ, тогда как фосфолипаза А значительно уменьшает стабильность ИФМ, практически не изменяя их проводимости. Добавка ЦТ



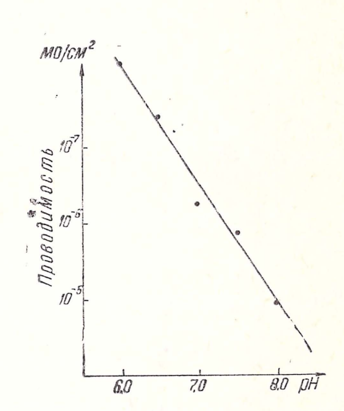




Рис. 8. Влияние ЦТ на стабильность ($T$) и сопротивление ($R$) БФМ. Среда: 150 мМ KCl; 5 мМ трис-HCl, pH 7.4; $x$—контроль. Использованы общие фосфолипиды из мембран эритроцитов человека.

Рис. 9. Зависимость проводимости БФМ, индуцированной ЦТ, от pH среды. Среда: 5 мМ трис-HCl; концентрация ЦТ $1 \cdot 10^{-6}$ М. Использованы общие фосфолипиды из мембран эритроцитов человека.

усиливает дестабилизирующее действие фосфолипазы А на мембраны, а ионы кальция тормозят этот процесс. Таким образом, результатом взаимодействия ЦТ с мембраной является увеличение пассивной проницаемости ее и, вероятно, как следствие,— набухание клеток с последующим их лизисом. Эффект ЦТ на проницаемость биологических мембран моделируется на ИФМ. Фос-

фолипаза А снижает только стабильность ИФМ; для совместного действия обоих ингредиентов характерно увеличение проницаемости и более значительное снижение среднего времени жизни

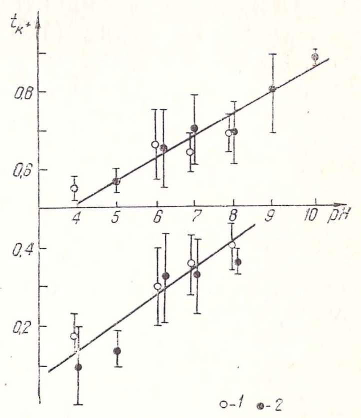



Рис. 10. Селективность модифицированных ЦТ ИФМ. Среда: 5 мМ трис-HCl или 5 мМ гицин-NaOH. Создавался трехкратный градиент KCl—20 мМ/60 мМ. С ростом pH среды для достижения равного уровня проводимости ИФМ применялись более низкие концентрации токсина. На оси абсцисс — величина pH среды, на оси ординат—число переноса иона $K^+$.

1—ИФМ сформирована из хроматографически чистого яичного лецитина; 2—ИФМ сформирована из общих фосфолипидов мозга быка. Каждая точка—среднее более 30 мембран со среднеквадратичной ошибкой.

ИФМ, т. е. синергизм, постоянно демонстрируемый на биологических мембранах (Lee, 1972; Condrea, 1974).

Представляется возможным, что благодаря комбинации в молекулах всех цитотоксинов ядов элапидов электроположительного

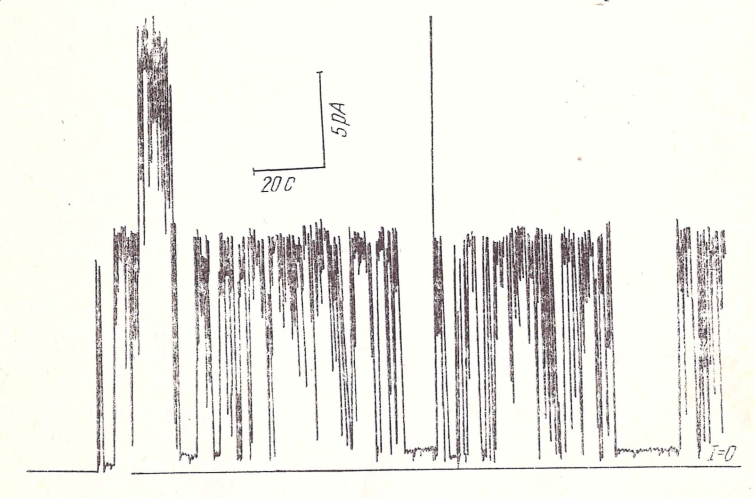



Рис. 11. Флуктуации проводимости ИФМ в присутствии $2 \cdot 10^{-6}$М ЦТ. Среда: 100 мМ KCl, 10 мМ трис-HCl, pH-07,5; напряжение фиксации 50 мВ; проводимость контрольных мембран≈4 pS.

заряда высокой плотности с гидрофобными свойствами они электростатически взаимодействуют с мембраной, после чего проникают в ее липидный остов, индуцируя проницаемость и последующие эффекты. При исследовании влияния ионной силы и pH сре-

ды доказано электростатическое взаимодействие цитотоксина с мембранами. Так, мы определили, что гемолитическое действие ЦТ в изотоническом растворе сахарозы (300 мМ сахарозы, 5 мМ трис-HCl, pH 7,5) значительно выше, чем в изотоническом растворе хлорида натрия (150 мМ NaCl, 5 мМ трис-HCl, pH 7,5) (рис. 12). Наши данные, демонстрирующие увеличение индуцированной ЦТ проницаемости ИФМ с ростом pH (рис. 9), коррелируют с результатами, показывающими рост гемолитического эффекта ЦТ при подщелачивании среды от pH 6,0 до 8,0 (Юкельсон и др., 1975). Можно полагать, что положительно заряженный ЦТ реагирует

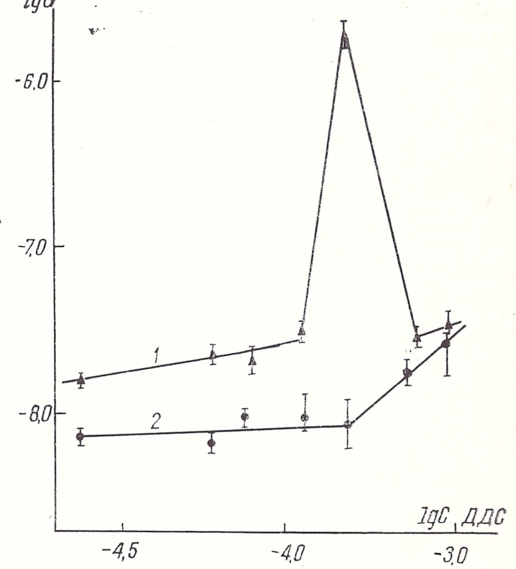



Рис. 12. Прямой гемолитический эффект ЦТ ($1 \cdot 10^{-5}$ М).

*1* — среда: 150 мМ NaCl, 5 мМ трис-HCl, pH-7,5, 37°С; *2* — среда: 300 мМ сахарозы, 5 мМ трис-HCl, pH-7,5. 37°С. 20% суспензия эритроцитов человека перед опытом прогрета 30 мин. при 37°С.

Рис. 13. Влияние додецилсульфата натрия на проводимость БФМ, индуцированную ЦТ. Среда: 150 мМ NaCl, 5 мМ трис, pH-7,4. Мембранообразующий раствор содержал хроматографически чистый яичный лецитин и холестерин (1/1; W/W).

*1* — ДДС+$2 \cdot 10^{-7}$ М ЦТ; *2* — контроль ДДС; ордината — логарифм проводимости (G — $ом^{-1} \cdot см^{-2}$), абсцисса — логарифм концентрации ДДС (моль/л).

с отрицательно заряженными группами на поверхности мембраны, ионизация которых возрастает с подщелачиванием среды, что облегчает связывание ЦТ и способствует усилению его эффектов.

Для более прямого доказательства электростатического взаимодействия мы изучали* влияние ЦТ на лецитин-холестериновые мембраны, отрицательный заряд которых индуцировался додецилсульфатом натрия (ДДС). Установлено, что при низких концен-

---

* Исследования проводились совместно с Р. И. Труфановым.

трациях ДДС ($2 \cdot 10^{-5}$—$1 \cdot 10^{-4}$ М) проводимость ИФМ, индуцированная ЦТ, несколько увеличивается, что подтверждает первоначально электростатический механизм взаимодействия токсина с мембранами (рис. 13, *1*). Резкое увеличение проводимости в присутствии ЦТ наблюдается в диапазоне 1,5—$3,0 \cdot 10^{-4}$ М ДДС, дальнейшее повышение концентрации детергента приводит к уменьшению эффекта ЦТ, т. е. влияние ЦТ на проводимость бислоев наиболее ярко проявляется в области ее структурной неустойчивости

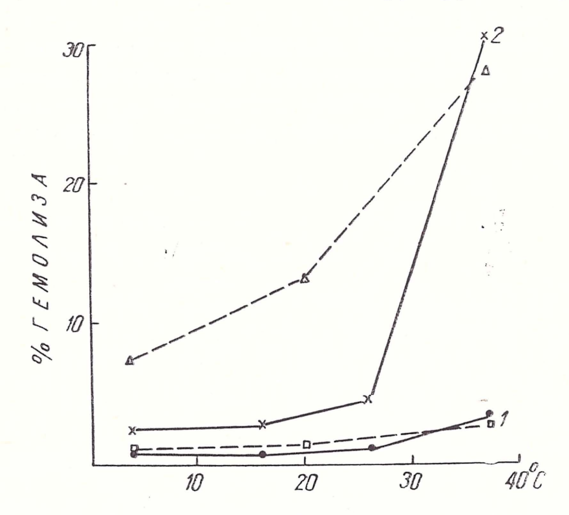



Рис. 14. Температурная зависимость прямого гемолитического эффекта цитотоксина. Среда: 300 мМ сахарозы. 5 мМ трис, рН-7,4. Использовались 30% эритроциты морской свинки.

*1*—контроль; *2*—$1 \cdot 10^{-5}$ М ЦТ; сплошные линии—инкубация 2 ч; пунктирные—эритроциты, предварительно прогретые 30 мин при 40°С, инкубация 35 мин.

(рис. 13, *2*). Чувствительность гемолитических (рис. 14) и других эффектов ЦТ (в отличие от такого известного токсина как мелиттин) к структурному состоянию мембран позволяет рекомендовать его в качестве своего рода «зонда» при исследовании конформационных переходов различных биомембран.

Если электростатическая природа первой фазы взаимодействия цитотоксинов с мембранами не вызывает сомнений, то по вопросу о значении гидрофобных взаимодействий в механизме их влияния на мембраны в литературе имеются разногласия (Vogt et al., 1970; Condrea, 1974; Юкельсон и др., 1974). Точка зрения Vogt et al. (1970), согласно которой в механизме действия цитотоксинов на мембраны в дополнение к электростатическим силам важную роль играют -S-S- -SH-взаимодействия, уже была подвергнута серьезной критике Condrea (1974). В своем отрицании значения гидрофобных свойств цитотоксинов Vogt et al. основываются на том,

что известны химические модификации цитотоксинов, сохраняющие ПА, но полностью потерявшие биологическую эффективность (Vogt et al., 1970; Habermann, Zenner, 1971). При этом не учитывается, что в процессе модификации (сукцинилирование, восстановление -S-S-связей и др.) изменяется активная конформация молекул цитотоксинов и, что крайне важно, может уменьшиться оснóвность полипептида.

В наших опытах ЦТ подвергали нагреванию на кипящей водяной бане в течение 30—180 мин в зависимости от величины pH. ПА токсина при этом почти не изменялась и даже несколько увеличивалась, тогда как биологическая активность изменялась значительно; гемолитическое действие становилось статичным, а способность потенцировать литическое действие фосфолипазы А полностью терялась.

| *Вариант* | *% гемолиза за* | | |
|---|---|---|---|
| | *45 мин* | *90 мин* | *135 мин* |
| 1. Контроль | 6,75 | 7,10 | 8,50 |
| 2. 17 мкг/мл нативного ЦТ | 14,8 | 30,2 | 37,5 |
| 3. 17 мкг/мл прогретого ЦТ | 14,0 | 14,5 | 15,1 |
| 4. 20 мкг/мл Фл-А | 10,3 | 10,6 | 11,0 |
| 5. 20 мкг/мл Фл-А+17 мкг/мл нативного ЦТ | 31 0 | 48,2 | 54,0 |
| 6. 20 мкг/мл Фл-А+17 мкг/мл прогретого ЦТ | 11,8 | 12,8 | 14,0 |

С помощью диск-электрофореза в ПААГе и гельфильтрации на сефадексе G-75 мы установили, что при тепловой обработке молекулы ЦТ агрегируют до ди- и тримеров, электрофоретическая подвижность которых уменьшается (возможно, не только вследствие увеличения размеров, но и из-за уменьшения оснóвности молекул ЦТ). В этой ситуации вполне возможно сохранение ПА при потере биологической активности.

Отрицательно заряженные группы мембраны, взаимодействующие с ЦТ, пока не установлены. По-видимому, ими являются полярные головки некоторых фосфолипидов (Braganca, Patel, 1972). В пользу этого предположения свидетельствует установленный нами факт, что основной эффект токсина — увеличение пассивной проницаемости мембран — может быть смоделирован на ИФМ. Однако исключить роль белкового компонента мембран в проявлении повреждающего мембрану действия ЦТ невозможно. Эту точку зрения подтверждает температурная зависимость гемолитического эффекта токсина; кроме того, в отличие от данных Condrea et al. (1971), мы установили, что 30-минутная трипсинизация, приводящая к 25—30%-ному уменьшению остатков сиаловой кислоты на поверхности эритроцитов, определенной по методу Warren (1959), значительно снижает их чувствительность к ЦТ (рис. 15). Влияние трипсинизации проявлялось значительно более четко в сахарозной среде.

Важным признаком цитотоксического действия мембраноактивных полипептидов является избирательность, продемонстрированная при исследовании их действия на различные клетки (Braganca et al., 1967), в том числе на эритроциты различных животных (Lee et al., 1971; Юкельсон и др., 1975). Установлен следующий ряд чувствительности эритроцитов к прямому гемолитическому действию цитотоксинов (в изотоническом растворе NaCl): морская свинка>кролик>крыса (Condrea et al., 1964; Lee et al., 1971).

Представляло интерес сопоставить эти результаты с данными по выходу ионов $K^+$ из указанных эритроцитов в присутствии ЦТ.

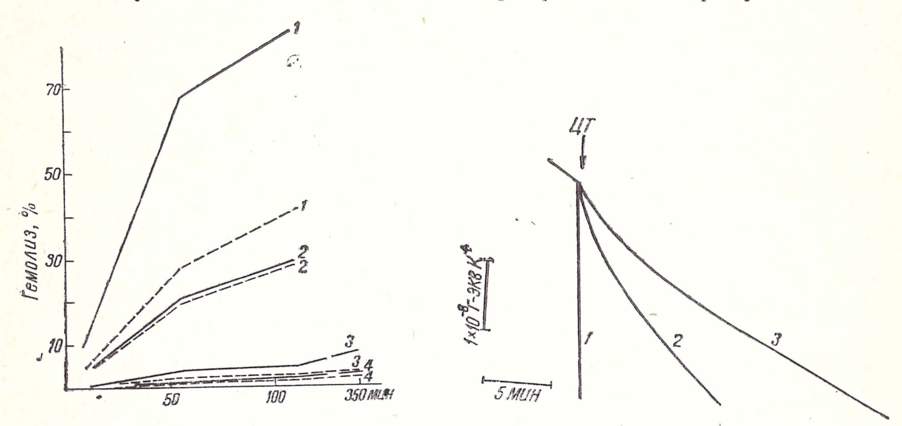



Рис. 15. Влияние трипсинизации и сахарозы на гемолитический эффект цитотоксина. Использовались эритроциты человека. Трипсинизация (240 мкг на мл среды) в сахарозной среде 30 мин при 37°С.

Сплошные линии—отмывка от трипсина сахарозной средой, в ней же проводили гемолиз при 20°С; пунктирные—отмывка от трипсина физиологическим раствором NaCl, в нем же проводили гемолиз при 20°С; *1*—норм. эритроциты+ЦТ ($1 \cdot 10^{-5}$ М); *2*—трипс. эритроциты+ЦТ; *3*—контроль, нормальные эритроциты; *4*—контроль, трипс. эритроциты.

Рис. 16. Индуцированный ЦТ ($1 \cdot 10^{-6}$ М) выход $K^+$ из эритроцитов различных животных. Среда: 150 мМ NaCl, 5 мМ трис, pH-7,5; $E_{750}$ суспензии-0,065.

*1*—эритроциты морской свинки, *2*—кролика, *3*—крысы.

При этом обнаружена полная корреляция: индуцированный ЦТ выход $K^+$ был наиболее интенсивен из эритроцитов морской свинки, в меньшей степени из эритроцитов кролика и крысы (рис. 16). Полученные данные показывают, что эффективность действия ЦТ на клетки определяется его способностью увеличивать пассивную проницаемость мембран этих клеток, и подтверждают наше предположение о важности этого эффекта в механизме действия ЦТ.

Существует точка зрения, согласно которой избирательность цитотоксинов обусловлена фосфолипидным составом мембран, причем резистентность отдельных клеток некоторые авторы связывают с повышенным содержанием сфингомиелина в их мембра-

нах (Turner et al., 1958). Однако мы не нашли корреляции между чувствительностью эритроцитов к токсину и проводимостью ИФМ, которые формировали из общих фосфолипидов этих клеток, в присутствии ЦТ.

| *ИФМ из фосфолипидов* | *Соотношение лецитин: сфингомиелин** | *Проводимость, мо/см², ·10⁻⁸* | |
|---|---|---|---|
| | | *контроль* | *$2 \cdot 10^{-7}$ М ЦТ* |
| Эритроцитов человека | 1,2:1—3:2 | 0,5 | 13 |
| Кролика | 2,2:1—3: | 0,67 | 12 |
| Крысы | 4:1 | 0,66 | 20 |
| Морской свинки | 4:1 | 0,77 | 23 |
| Мозга быка | 1,7:1 | 0,48 | 15 |
| Лецитина (Олайнский завод) | | 0,77 | 14 |
| Окисленного холестерина | | 1,3 | 6,2 |

* По Gerken, Brockmann (1969), Condrea et al, (1964), Nelson (1967) Zwaal et al. (1973).

Ввиду того, что состав ИФМ может значительно отличаться от фосфолипидного состава мембранообразующего раствора, полученные данные не дают основания отрицать предположение Turner et al. Лишь на ИФМ из окисленного холестерина эффект ЦТ был значительно ниже. Поэтому можно предположить, что различная чувствительность клеток к ЦТ определяется содержанием холестерина в свободных от белка участках поверхности их мембран.

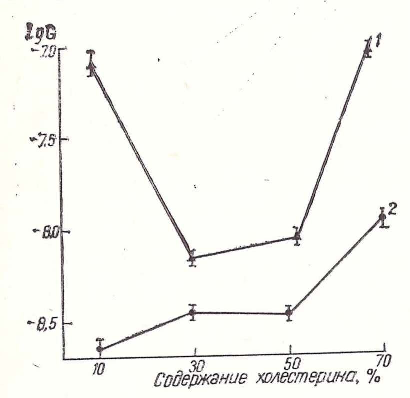



Рис. 17. Влияние цитотоксина на лецитин-холестериновые бислойные мембраны. Среда: 150 мМ NaCl, 5 мМ трис, pH-7,4. Концентрация ЦТ-$1 \cdot 10^{-6}$ М.

*1*—проводимость ИФМ в присутствии ЦТ, *2*—проводимость контрольных ИФМ, на оси ординат—логарифм проводимости ИФМ ($G$—ом$^{-1}$ ·см$^{-2}$).

Мы провели ряд экспериментов* по действию ЦТ на лецитин-холестериновые ИФМ. Установлено (рис. 17), что проводимость контрольных ИФМ возрастает с увеличением концентрации холестерина в бислое: минимальная проводимость отмечена у мембран, содержащих 10% холестерина, наибольшая — при 70%, промежуточная — при 30 и 50%, что согласуется с данными литературы (Kimelberg, Papahadjopoulos, 1973) по влиянию холестерина на подвижность жирнокислотных цепей фосфолипидов. При добавлении ЦТ в концентрации $10^{-6}$ М проводимость ИФМ увеличивалась более выраженно у бислоев, содержащих 10 и 70% холестерина,

* Совместно с Р. И. Труфановым.

в то время как проводимость мембран, содержащих 30 и 50% холестерина, изменялась незначительно. Вероятно, такая зависимость объясняется «уравновешивающим» (Boggs, Hsia, 1972) влиянием холестерина на структуру мембран. Данные экспериментов показывают, что действие ЦТ ярко проявляется лишь на «жидких» мембранах. Следовательно, холестерин, действительно, может играть регулирующую роль в действии ЦТ на различные естественные мембраны.

Резюмируя, можно заключить, что имеется 2 этапа в механизме взаимодействия ЦТ и фосфолипазы А яда кобры с мембранами: 1) адсорбция ЦТ на поверхности мембран, обусловленная электростатическими силами и приводящая к активации связывания с ними фосфолипазы А; 2) гидрофобное взаимодействие ЦТ с фосфолипидным остовом мембран, сопровождающееся лабилизацией их структуры и повышением доступности мембранных фосфолипидов для действия фосфолипазы А.

Результаты, полученные на ИФМ, позволяют предполагать, что взаимодействие ЦТ с фосфолипидным бислоем мембран может приводить к образованию доменов в ИФМ, которые могут проявляться как флуктуации проводимости с фиксированными амплитудами тока. Величины амплитуд этих каналов, возможно, зависят от количества фосфолипидов в доменах.

По аналогичному механизму, по-видимому, действует α-стафилотоксин (Bernheimer, 1974; Красильников и др., 1980 а), а также другие токсические белки растительного и животного происхождения, для которых установлены разнообразные биологические эффекты, сочетание в структуре молекул гидрофобных свойств с положительным зарядом, способность к потенцированию эффектов фосфолипазы А и влияние на проницаемость мембран (Habermann, 1972; Hessinger, Lenhoff, 1973; Samuelson et al., 1974). Некоторые различия в кинетике действия этих веществ могут быть обусловлены особенностями их химического строения, не нарушающими общего принципа — комбинации гидрофобности с основностью, что подтверждено и изучением химически модифицированного ЦТ (Красильников, 1980 б). Благодаря этому они реализуют свои эффекты по механизму, описанному выше.

## ЛИТЕРАТУРА

Бабаков А. В. и др. 1972. Исследование скачка электрического потенциала для фосфолипидных монослоев на границе раздела вода—воздух и физико-химические свойства фосфолипидных мембран. «Биофизика», 17, 347—350.

Гаркинс В. Д. 1950. Измерение поверхностного натяжения. Исследование свойств монослоев. — В кн. «Физические методы в органической химии», т. I. М., 163—269.

Корепанова Е. А. 1975. Взаимодействие основных молекулярных белков с заряженными модельными и биологическими мембранами. Автореф. канд. дис., М.

Красильников О. В. и др. 1980а. Влияние токсина стафилококка на проводимость бислойных фосфолипидных мембран. ДАН УзССР, № 7, 66—68.

Красильников О. В. 1980б. Влияние химических модификаций цитотоксического полипептида яда среднеазиатской кобры на его мембранную активность. «Узб. биол. журн.», № 4, 8—10.
Ксенжек О. С. и др. 1978. Взаимодействие кардиотоксина из яда кобры Naja naja oxiana с модельными фосфолипидными мембранами. «Молек. биология», 12, 1057—1065.
Лев А. А. 1975. Ионная избирательность клеточных мембран. Л.
Либерман Е. А. 1970. Мембраны (ионная проницаемость, возбудимость, управление). «Биофизика», **15**, 287—297.
Либерман Е. А., Ненашев В. А. 1970. Моделирование взаимодействия клеточных мембран на искусственных фосфолипидных мембранах. «Биофизика», **15**, 1014—1021.
Нейман Р. Э. 1972. Практикум по коллоидной химии латексов и поверхностно-активных веществ. М.
Овчинников Ю. А., Иванов В. Т., Шкроб А. М. 1974. Мембраноактивные комплексоны. М.
Сахибов Д. Н., Сорокин В. И., Юкельсон Л. Я. 1970. Выделение фосфолипазы А из яда среднеазиатской кобры. «Биохимия», **35**, 13—16.
Юкельсон Л. Я., Садыков Э. С., Сорокин В. М. 1973. Прямой гемолитический фактор яда среднеазиатской кобры. «Узб. биол. журн.», № 4, 12—15.
Юкельсон Л. Я. и др. 1974. Влияние «прямого» гемолитического фактора яда на проводимость бимолекулярных фосфолипидных мембран. «Химия природ. соединений», № 5, 688.
Юкельсон Л. Я., Садыков Э. С., Сорокин В. М. 1974. Выделение и характеристика «прямого» гемолитического фактора яда среднеазиатской кобры. «Биохимия», **39**, 816—821.
Bernheimer A. 1974. Biochem. et Biophys. Acta, **344**, 1, 27—50.
Boggs J. M., Hsia J. C. 1972. Biochem. et Biophys. Acta, **290**, 32—42.
Braganca B., Patel. T. N. 1972. Biochem. J., **187**, 46.
Braganca B., Patel T. N., Badrinath P. G. 1967. Biochem. et Biophys. Acta, **136**, 3, 508—520.
Chang C. et al. 1972. Brit. J. Pharmacol., **44**, 4, 752—764.
Condrea E. 1974. Experientia, **30** (2), 121—129.
Condrea E., Kendzersky I., Vries A. de 1965. Experientia, **21**, 461—467.
Condrea E., Barzilay M., Vries A. de 1971. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak., **268**, 458—461.
Condrea E. et al. 1964. Biochem. et Biophys. Acta, **84**, 4, 365—375.
Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. H. 1957. J. Biol. Chem., **226**, 1, 497—509.
Gercken G., Brockmann U. 1969. European. J. Biochem., **8**, 4, 489—494.
Grishin E. V. et al. 1974. FEBS Lett., **48**, 2, 179—183.
Hapermann E., Zenner G. 1971. Nainyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol., **270**, 1, 1—9.
Habermann E. 1972. Science, **117**, 314—322.
Hessinger D. A., Lenhoff H. M. 1973. Biochem. Biophys. Res. Communs. **53**, 2, 475—481.
Kimelberg H. K., Papahadjopoulos. D. 1973. 9-th Int. Congr. Biochem., Stockholm, 1973, Abstr. Book, 257.
Lee C. Y. 1972. Ann. Rev. Pharmacol., **12**, 265—281.
Lee C. Y., Lin J. S., Wéi J. W. 1971, in: «Toxin of animal and plant origin. vol. 2» Eds. Vries A. de, Kochva E. Gordon and Breach Science Publishers, New—York — London — Paris.
Mueller P. et al. 1963. J. Phys. Chem., **67**, 2, 534—535.
Nelson G. J. 1967. Biochim. et Biophys. Acta., **144**, 2, 221—232.
Salach J. I. et al. 1971. J. Biol. Chemistry **246**, 2, 331—339.
Samuelsson G., Jayawardene A., Lakhsman. 1974. Acta Pharm. succ., **11**, 2, 1975—184.
Singelton W. S. et al. 1965. J. Amer. Chem. Soc., **42**, 53.

Tien H. T., Carbone S., Dawidowicz E. A. 1966. Nature, **212**, 5063, 718—719.
Turner J. C., Anderson H. M., Gandal Ch. P. 1958. Biochim. et Biophys. Acta, 30, 1, 130—134.
Vogt W. et al. 1970. Naunyn-Schmiedebergs Arch, Pharmak., 265, 442—445.
Warren L. 1959. J. Biol. Chem., 234, 1971.
Zwaal R. F. A., Roelofsen B., Colley C. M. 1973. Biochim. et Biophys. Acta, 300, 2, 159—182.

М. У. ТУЙЧИБАЕВ, Ф. А. МУКСИМОВ

# ЯДЫ ПЕРЕПОНЧАТОКРЫЛЫХ (HYMENOPTERA)

Яды животного происхождения содержат различные фармакологически и биологически активные вещества полипептидного характера. Интерес к этим ядам и их компонентам обусловлен возможностью их использования при изучении строения, структуры биологических мембран в целом, полиферментных систем, встроенных в мембраны, нейрорецепторов, ионных каналов и т. д. Так, с помощью α-бунгаротоксина из возбудимых мембран электрического ската был выделен в чистом виде холинорецептор (Changeux et al., 1970; Miledi et al., 1971). В последние годы широко применяются токсины ядов скорпиона и некоторых змей для изучения $Na^+$, $K^+$ и $Ca^{2+}$-каналов в возбудимых мембранах (Remey et al., 1975; Narahashi, 1975; Catteral, 1975).

К настоящему времени компоненты ядов различных змей и скорпионов изучены хорошо. Выделены в высокоочищенном состоянии и определены структуры (аминокислотная последовательность) некоторых нейротоксинов, цитотоксинов, фосфолипаз (Slotta, Vick, 1969; Condrea et al., 1970; Takechi et al., 1972; Zlotkin et al., 1972а, б, 1975; Carlson, 1974; Louw, 1974а, б; Grishin et al., 1974; Юкельсон и др., 1975; Joubert, 1975; Гришин и др., 1976).

Яды перепончатокрылых (Hymenoptera) подобно другим ядам, в частности ядам змей, содержат в своем составе ферменты, токсичные белки и полипептиды неэнзиматического характера. Вместе с тем, яды перепончатокрылых отличаются от других ядов ограниченным числом компонентов, что облегчает более полное их изучение.

Среди ядов различных представителей перепончатокрылых хорошо изучен яд пчелы (Apis mellifera). Яд пчелы представляет собой смесь нескольких биогенных аминов, цито- и нейротоксинов, ферментов (Habermann, 1972). По составу он близок к ядам ос и шершней.

| *Пчела* | *Оса* | *Шершень* |
|---|---|---|
| | Биогенные амины | |
| Гистамин | Гистамин | Гистамин |
| | Серотонин | Серотонин |
| Допамин | Допамин | Ацетилхолин |
| Норадреналин | Норадреналин | |
| (Owen, 1971) | (Owen, 1971) | |

Токсические белки и пептиды

| | | |
|---|---|---|
| Мелитин<br>Арамин<br>МСД-пептид<br>Минимин (Lewy et al., 1971) | Wasp-кинин | Hornet-кинин |

Ферменты

| | | |
|---|---|---|
| Фосфолипаза А<br>Фосфолипаза В (?)<br>Гиалуронидаза | Фосфолипаза А<br>Фосфолипаза В<br>Гиалуронидаза | Фосфолипаза А<br>Фосфолипаза В |

В составе яда пчелы среди биогенных аминов по количественному содержанию преобладает гистамин. Его количество варьирует в различных препаратах яда от 0,2 до 1,7% (Neumann, Habermann, 1954; Russell, 1967). Допамин и норадреналин обнаружены в ядовитых мешочках in vivo и отсутствуют в составе высушенных препаратов ядов пчел и ос (Habermann, 1954). Все эти биогенные амины не определяют токсичности цельного яда.

Токсический эффект цельного яда пчелы приписывают его фосфолипазной активности, хотя главным компонентом яда является низкомолекулярный пептид мелитин (Habermann, 1972). По-видимому, токсический эффект яда пчелы обусловлен прямым гемолитическим эффектом его главного компонента мелитина. С применением комплексных методов исследования (гельфильтрация, хроматография, электрофорез, фармакологические и биохимические анализы) из цельного яда выделены в очищенном виде 2 фермента — фосфолипаза А и гиалуронидаза, цитотоксин мелитин, нейротоксин апамин, МСД-пептид, минимин, секапин, тертиапин и пептид 401 (Habermann, Reiz, 1964; 1965а, б; Fredholm, 1966; Habermann, 1968; Lowy et al., 1971; Gauldie et al., 1976).

Молекулы низкомолекулярных пептидов яда пчелы состоят из 18—26 аминокислотных остатков. Следовательно, их молекулярные веса находятся в пределах 2000—3000 дальтон (табл. 1).

Основной компонент пчелиного яда — щелочной пептид мелитин, содержание которого превышает 40—50% от веса сухого вещества цельного яда. Молекула мелитина состоит из 26 аминокислотных остатков с молекулярным весом 2817 (Habermann, 1972; Gauldie et al., 1976). Методом гельфильтрации и ультрацентрифугирования установлено, что молекулярный вес мелитина равен примерно 12080—12500 (Habermann, Kowallek, 1970; Cauldie et al., 1976). По-видимому, мелитин в растворах представлен формой агрегата, состоящей из 4 или 5 мономеров. Впервые была установлена аминокислотная последовательность молекул мелитина европейской домашней пчелы Apis mellifera (Haberman, Jentsch, 1967).

В работах Kreil, Kiss (1967), Lubke, Matthes, Kloss, (1971 а) полностью подтверждена структура мелитина, установленная Habermann et al. (1967). Более того, Lubke et al. (1971 а, б) удалось синтезировать 4 аналога природного мелитина, которые по

токсичности на мышах и специфической активности не уступали мелитину, выделенному из яда пчелы. В дальнейшем была установлена аминокислотная последовательность еще двух мелитинов, изолированных из ядов Apis cerana и Apis florea (Kreil, 1973). Оказалось, что молекулы мелитинов, полученных из ядов A. mellifera и A. cerana, полностью идентичны. Молекулы же мелитина из яда

Таблица 1

**Аминокислотный состав и N-концевые аминокислоты пептидов яда пчелы (по Gauldie et al., 1976)**

| Аминокислота | Апамин | Секапин | Тертиапин | Пептид 401 | Мелитин-Г | Мелитин |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Аспарагиновая к-та+аспарагин | 1 | 2 | 2 | 2 | — | — |
| Треонин | 1 | — | — | — | 2 | 2 |
| Серин | — | 1 | — | — | 1 | 1 |
| Глутамин. к-та +глутамин | 3 | — | — | — | 2 | 2 |
| Пролин | ! | 5 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Глицин | — | 1 | 1 | 1 | 1 | 3 |
| Аланин | 3 | — | 1 | — | 1 | 2 |
| Валин | — | 3 | — | 1 | 1 | 2 |
| Цистеин | 4 | 2 | 4 | 4 | — | — |
| Метионин | — | — | 1 | — | — | — |
| Изолейцин | — | 3 | 2 | 4 | 2 | 3 |
| Лейцин | 1 | — | 1 | — | 3 | 4 |
| Тирозин | — | 1 | — | — | — | — |
| Фенилаланин | — | 1 | — | — | — | — |
| Лизин | 1 | 2 | 4 | 5 | 2 | 3 |
| Гистидин | 1 | — | 1 | 2 | — | — |
| Аргинин | 2 | 3 | 1 | 2 | 2 | 2 |
| Триптофан | — | — | 1 | — | 1 | 1 |
| Сумма | 18 | 24 | 20 | 22 | 19 | 26 |
| N-концы | Цис | Тир | Ала | Иле | Вал | Гли |

A. florea значительно отличаются от них (схема 1). Так, в молекуле мелитина A. flerea в 5-м положении валин заменен изолейцином, в 10-м — триптофан-аланином, в 15-м — аланин-триптофаном, в 22-м аргинин-аспарагином и в 25-м — глутамин-лизином (Kreil, 1973; Habermann, 1974).

Биохимии и фармакологии мелитина и других пептидов ядов перепончатокрылых посвящены обзорные работы Habermann (1972, 1974); Russell, (1967). Мелитин, вызывая лизис фосфолипидного состава биомембран, повреждает структуру и функциональное состояние клеток и субклеточных компонентов, а также липосом (Sessa et al., 1969; Olson et al., 1974; Шкинев и др., 1978). Его мембранная активность, по-видимому, обусловлена такой последовательностью аминокислот, где 1—20-я аминокислоты имеют преимущественно гидрофобный характер, тогда как 21—26-я

аминокислоты: -Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln-Gln$NH_2$ — гидрофильны (Sessa et al., 1969).

Мелитин в низких концентрациях в несколько раз увеличивает скорость переноса ионов $H^+$, $K^+$, $Na^+$, триса$^+$ и в меньшей степени — двухвалентных катионов, а также $Cl^-$, но не сахарозы (Шкинев и др., 1978). Высокие его концентрации вызывают нарушение механизма трансформации энергии в митохондриях, приводят к полному разобщению окислительного фосфорилирования (Olson

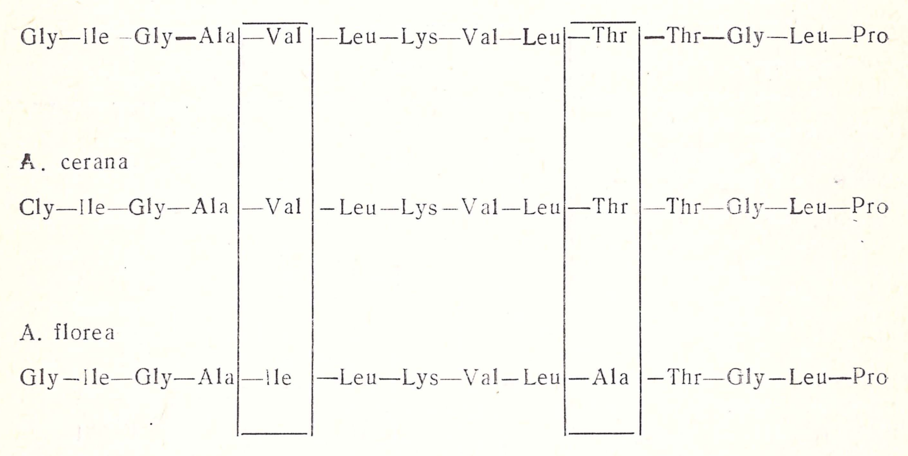



Схема 1. Первичная структура мелитина

et al., 1974; Habermann, 1954 б). Мелитин, подобно цитотоксинам, выделенным из ядов змей, усиливает активность фосфолипазы $A_2$ (Habermann, 1974; Юкельсон и др., 1975; Красильников, Юкельсон, Ташмухамедов, 1976). Кроме цитотоксического действия мелитин в концентрациях 0,05—2% обладает антибактериальным и антигрибковым свойствами (Derman, Markley, 1971).

Путем гельфильтрации на сефадексе G-50 была выделена фракция пептида, обладающая нейротоксической активностью. Этот нейротоксин в дальнейшем был очищен хроматографией на КМ-целлюлозе и назван апамином. Его $ЛД_{50}$ примерно 4 мг/кг веса мышей (Habermann, Reiz, 1964, 1965а, б). Апамин, в отличие от других нейротоксинов, выделенных из ядов скорпионов (Zlotkin et al., 1972а, б; 1975) и некоторых змей (Chandaux et al., 1970; Condrea, Barrilav, 1970; Miledi et al., 1971) не отличается высокой избирательностью. Апамин вызывает у животных некоординированные движения, спазмы и судороги (Habermann, 1972).

Молекула апамина состоит из 18 аминокислотных остатков и имеет молекулярный вес 2036. Известна его аминокислотная последовательность (Shipolini et al., 1967; Haux et al., 1967; Calleuwaert et al., 1968). По данным Calleuwaert et al. (1968), в мо-

лекуле апамина 4 молекулы цистеина, связываясь между собой, образуют 2 дисульфидных мостика, цистеин соединен в положениях 3-м и 15-м, 1-м и 11-м, что определяет пространственную конфигурацию молекулы (схема 2).

При хроматографии на КМ-целлюлозе апамин с колонки выходит в 2 фракциях (Habermann, 1972). Апамин является нейротоксическим полипептидом центрального действия, образующим достаточно стабильную связь с мишенью в организме.

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| —Ala | —Leu—Ile—Ser—Trp—Ile—Lys | —Arg | —Lys—Arg | —Gln | —$GlnNH_2$ |
| —Ala | —Leu—Ile—Ser—Trp—Ile—Lys | —Arg | —Lys—Arg | —Gln | —$GlnNH_2$ |
| —Thr | —Leu—Ile—Ser—Trp—Ile—Lys | —Asn | —Lys—Arg | —Lys | —$GlnNH_2$ |

(по Habermann, 1974).

Другие нейротоксины — скорпамин яда скорпиона Androctenus aistralis, кротамин яда Crotalus terrificus и нейротоксины яда Naja species (Breithaupt, Habermann, 1968; Haux, 1969; Habermann, 1972) содержат около 60 аминокислот. Нейротоксины влияют избирательно на нервно-мышечные синапсы. Оба апамина и все перечисленные нейротоксины характеризуются сильной щелочностью и высоким содержанием серы. Содержание апамина в яде пчелы невелико, примерно 2—3% цельного яда (Gauldie et al., 1976).

Из яда пчелы A. mellifera был выделен также МСД-пептид. Название объясняется его биологической функцией — mast cell destroying (Breithaut, Habermann, 1968). МСД-пептид состоит из 22 аминокислотных остатков. Установлена его первичная структура (Haux, 1969) (рис. 2). МСД-пептид при внутривенном введении мышам практически не токсичен ($ЛД_{50}$ 40 мг/кг). Однако высокие дозы его вызывают коротко-постоянное возбуждение и спазмы. МСД-пептид, в отличие от мелитина, вызывает дегранулирование только интактных клеток.

Яды других представителей перепончатокрылых, в частности ос и шершней, изучены недостаточно. По-видимому, это объяс-

S—S (Cys 3 — Cys 15)

Cys—Asn—Cys—Lys—Ala—Pro—Glu—Thr—Ala—Leu—Cys—Ala—Arg—Cys——Gln—Gln—His$NH_2$ Apamin(Shipolini

S—S (Cys 1 — Cys 11)

1967; Haux, Sawerthal, Habermann, 1967; Callewaert, Shipolini, Vernon, 1968)

Asn—Cys—Lys—Ile
|
Cys—Lys—Arg—His—Val—Ile—Lys—Pro—His—Ile—Cys—Arg—Lys—Ile—Cys—Gly—Lys—Asn $NH_2$ MCD—peptide (Haux, 1969)

Tyr—Thr—Asn—Lys—Lys—Lys—Leu—Arg—Gly—Arg—Pro—Pro—Gly—Phe—Ser—Pro—Thr—Arg Wasp kinin (Habermann, 1972)

Схема 2. Аминокислотная последовательность апамина, МСД-пептида и Wasp кинина.

няется тем, что почти невозможно собрать достаточное количество яда для структурных исследований. Поэтому многие исследователи ограничиваются изучением только фармакологического эффекта (O'Conner, Rassubrook, 1963; Fischl et al., 1972; Edery et al., 1972; Isay et al., Sandbank et al., 1973; Laplinsky et al., 1974; Marr, Bexter, 1974).

По данным Jaques и Schachter (1954), в ядах осы (Vespa vulgaris) и шершня (Vespa Crabro) присутствуют из биогенных аминов серотонин и гистамин. В яде шершня в значительном количестве содержатся 3 амина (до 5% от сухого веса яда), из которых наибольшее количество приходится на долю ацетилхолина (Bhoula et al., 1961). В экстрактах ядовитого мешочка Vespula masculata и Vespula maculifrons обнаружены гистамин, допамин и норадреналин. Состав экстрактов ядовитого мешочка у обоих организмов сходен, но не идентичен яду ос, пчел и других шершней (Geller et al., 1976).

Цитотоксины и нейротоксины, такие как мелитин, МСД-пептид, апамин, минимин, тертиапин, присутствующие в яде пчелы, не были обнаружены в составе ядов ос и шершней. Вместо них найдены кининоподобные пептиды, названные Wasp-кинин и Hornet-кинин. Так, из яда V. Vulgaris и V. polistes выделены 3 фракции, обладающие кининоподобной активностью (Schachter, 1963). Кининоподобные пептиды обнаружены также в яде Vespula maoulifrons (Geller et al., 1976). Только Wasp-кинин был выделен в очищенном состоянии и установлена его первичная структура (Habermann, 1972) (схема 2).

При триптическом гидролизе из молекулы Wasp-кинина образуется глицил-брадикинин и щелочной пептид из 8 аминокислотных остатков. Фармакологическим тестом для кининов служат обычно гладкие мышцы животных.

Ферменты являются обязательным компонентом всех ядов животного происхождения и насекомых. Яды могут различаться качественным и количественным наборами ферментов. Например, яды перепончатокрылых содержат очень ограниченное число ферментов по сравнению с ядами животных, в частности, змеиными ядами. В змеиных ядах идентифицированы около 20 ферментов: фосфолипазы А и В, протеиназа, трансаминаза, гиалуронидаза, L-аминооксидаза, фосфатаза, холинэстераза, рибонуклеаза, фосфомоноэстераза, фосфодиэстераза, гиалуронидаза, $5^1$-нуклеотидаза, АТФаза и др. (Russell, 1967; Mebs, 1970; Сорокин, Нигматов, Юкельсон, 1972), тогда как в ядах пчел, ос и шершней обнаружены лишь 3—4 фермента: фосфолипазы А и В, гиалуронидаза и гистидин-декарбоксилаза (Habermann, 1972; Geller et al., 1976).

В яде пчелы гиалуронидаза содержится в очень малых количествах — около 2—3% от сухого вещества яда (Habermann, 1957). Она выделена в очищенном виде и частично охарактеризована. Определены pH-оптимум, N-концевая аминокислота и ами-

нокислотный состав (Krysteva et al., 1973). Гиалуронидазы в составе яда шершней не обнаружены.

Фосфолипаза B присутствует почти во всех изученных ядах перепончатокрылых, однако она не выделена в очищенном виде. О ее присутствии в составе тех или иных ядов судят по ферментативной активности цельного яда или его фосфолипазной A фракции.

Фосфолипаза $A_2$ как по количественному содержанию, так и по токсичности для организма является одним из главных токсических компонентов яда сем. перепончатокрылых. Некоторое исключение составляет яд пчелы, где гемолитическая активность яда лимитируется прямым гемолитическим эффектом мелитина. Однако в присутствии мелитина литическая активность фосфолипазы резко увеличивается (Красильников, Юкельсон, Ташмухамедов, 1976). В ядах ос и шершней, в составе которых отсутствуют цито- и нейротоксические пептиды, токсичность, по-видимому, определяет фосфолипаза $A_2$ (Туйчибаев и др., 1976, 1977). Все свойства этого фермента (химия, биохимия, фармакология) подробно описаны в обзорах Meldrum (1965), Condrea, de Vries (1965), Van Deenen, de Haas (1966), Брокерхофа и Дженсена (1978).

В пчелином (Apis mellifera) яде присутствует несколько форм фермента. Shipolini et al. (1971 а, б) описали выделение большинства из них. С помощью гельфильтрации и последующей хроматографии на колонке с SE-сефадексом при 3 различных значениях pH авторы выделили высокоочищенную фракцию фосфолипазы $A_2$. Подробно изучены физико-химические свойства и установлена аминокислотная последовательность молекулы. Молекулярный вес фермента, определенный методом гельфильтрации и ультрацентрифугования, составляет около 19 000. Однако молекулярный вес белка, рассчитанный с учетом аминокислотной последовательности, равен 14 629. Эти различия объясняются содержанием углеводов, ковалентно привязанных к молекуле фермента. Например, конец аминокислотной цепи от изолейцина (1) до лизина (14) содержит глюкозамин, маннозу, галактозу и фукозу (Shipolini et al., 1971 б), следовательно, фосфолипаза $A_2$ яда пчелы является гликопротеином. Ее белковая молекула состоит из 129 аминокислотных остатков. N-концевая аминокислота — изолейцин, а с-концевая — тирозин; в молекуле имеется 4 дисульфидных мостика. Фосфолипаза $A_2$ встречается в составе яда в виде мономера или димера с молекулярными весами 19000 и 40000 соответственно. Имеет по крайней мере 5 изомеров. Оптимум pH действия широкий: от 7,5 до 9,0.

Таким образом, на основании изложенных выше литературных данных можно заключить, что яд пчелы подвергнут более подробному химическому, биохимическому и фармакологическому анализу, чем яды других представителей семейства перепончатокрылых (Hymenoptera), в частности ос и шершней. В составе яда пче-

лы (Apis mellifera) идентифицированы 3 группы токсических компонентов: 1) ферменты — фосфолипазы А и В и гиалуронидаза; 2) низкомолекулярные полипептиды — нейро- и цитотоксины (апамин, мелитин, МСД-пептид, минимин, секапин, тертиапин); 3) биогенные амины — гистамин, допамин, норадреналин. В отличие от пчелиного яда, в составе яда осы и шершня отсутствуют нейро- и цитотоксические пептиды, но найдены кининоподобные пептиды. Если основным токсическим компонентом яда пчелы является цитотоксин мелитин, то в ядах ос и шершней этим компонентом, по-видимому, является фосфолипаза А. Установлена первичная структура фосфолипазы $A_2$, мелитина, апамина и МСД-пептида яда пчелы; из компонентов яда ос и шершней выделен в чистом

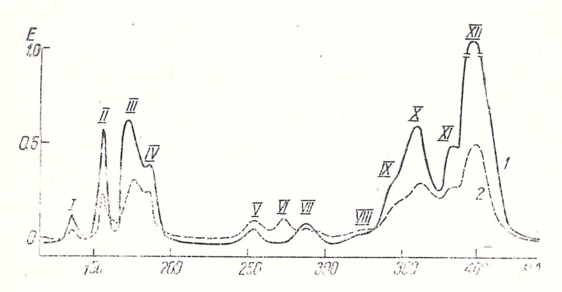



Рис. 1. Гельфильтрация цельного яда шершня на колонке с сефадексом G-50.

*1* — $E_{280}$; *2* — $E_{206}$.

виде только один кининоподобный пептид и определена его аминокислотная последовательность. Поэтому подробное исследование любого яда представляет большой интерес в связи с поиском новых мембраноактивных агентов.

Мы исследовали яд большого шершня (Vespa orientalis), распространенного в основном в республиках Средней Азии, Афганистане, Пакистане и Индии. Имеющиеся в литературе данные по этому яду ограничиваются лишь изучением фармакологических эффектов цельного яда и его отдельных неочищенных фракций (Edery et al., 1972; Isay et al., 1973; Sandbank et al., 1973; Kaplinsky et al., 1974). В этих работах исследовано содержимое ядовитого мешочка или его экстракты. В наших экспериментах использован лиофильно высушенный яд, полученный методом электростимуляции последних члеников брюшка в области ядовитой железы (Туйчибаев и др., 1977).

При гельфильтрации цельного яда на колонках с сефадексом G-50 получены 12 фракций (рис. 1). Первые 4 имеют молекулярный вес в пределах 10000—40000, последующие 3 — около 2000—5000, а остальные компоненты представляют собой низкомолекулярные вещества с молекулярным весом не более 2000. В отличие от пчелиного яда, где около половины белкового содержания при-

ходится на долю мелитина, в яде шершня основным по УФ-поглощению компонентом является фракция XII, содержащая, по-видимому, очень низкомолекулярные пептиды, биогенные амины, свободные аминокислоты и другие вещества, имеющие поглощение в УФ-части спектра. На электрофореграмме этой фракции отсутствуют белковые полосы. Фракция XII не оказывает действия на мембранные системы.

Количественное содержание фракций I—IV составляет примерно 25% от сухого веса яда (I ~ 1%; II ~ 5%; III+IV ~ 19%). Из сравнения оптического поглощения при 206 и 280 нм можно заключить, что для фракций III—IV характерно высокое содержание триптофана и тирозина, а пептидные компоненты фракции VI практически лишены этих компонентов.

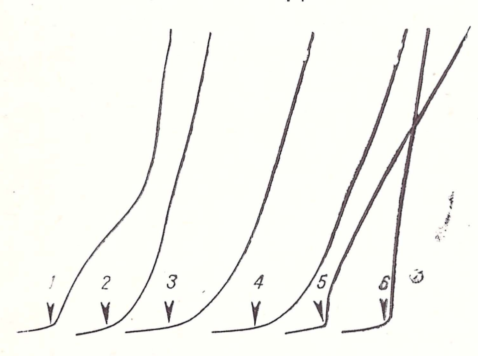


Рис. 2. Изменение скорости выхода ионов $K^+$ из эритроцитов под действием цельного яда шершня и его фракций.
*1*—цельный яд; *2—6*—II—VI фракции соответственно.

При анализе цельного яда и его компонентов методом дискэлектрофореза на ПААГ в цельном яде выявляются всего 6—8 компонентов в зависимости от партии яда. Во фракции I, элюированной на колонке с сефадексом $G=50$, обнаруживается 1 или 2 электрофоретических компонента, не проявляющиеся в электрофореграмме цельного яда, по-видимому, из-за малого количества. Остальные фракции также электрофоретически неоднородны. На электрофореграммах фракции VIII—XII белковые компоненты не обнаруживаются. По аналогии с ядами ос и других шершней (Schachter, 1963; Habermann, 1972; Geller et al., 1976) именно в этих фракциях, по-видимому, присутствуют биогенные амины. В первых четырех фракциях (I—IV), главным образом во фракции III+IV, сосредоточена активность фосфолипазы А. Во фракциях V—VII, также как в ядах других шершней, содержатся, видимо, кининоподобные пептиды. Так, Schachter (1963) выделил из яда V. vulgaris и V. polister 3 фракции, обладающие кининоподобной активностью.

Мы исследовали действие цельного яда и его фракций на биологические (эритроциты, митохондрии) и искуственные бислойные фосфолипидные мембраны (БФМ). Результаты показывают (рис. 2), что цельный яд в низких концентрациях (10 мкг/мл) вызывает резкое увеличение пассивного выхода ионов $K^+$ во внешний раствор с последующим гемолизом эритроцитов. Кривые изменения скорости выхода ионов $K^+$ из эритроцитов во времени имеют вид, характерный для действия фосфолипазы $A_2$, выделенной нами в чистом виде из яда шершней. Фракции II, III и IV,

фосфолипазная активность которых составляет соответственно 520, 1600 и 183 мкмоль/мг белка, имитируют эффекты цельного яда и их действие проявляется в более низких концентрациях (10, 0, 4 и 1,0 мкг/мл). Фракции V и VI также вызывают сильный гемолиз мембран эритроцитов, однако этот эффект кинетически отличается от действия цельного яда и фракций II—IV и в значительной степени имеет сходство с эффектами, вызываемыми цито-

Таблица 2

**Влияние цельного яда шершня и его фракций на некоторые параметры окислительного фосфорилирования митохондрий печени крыс**

| Компонент | Концентрация, мкг/мг | Субстрат | Скорость дыхания на атом, 0/мг белка в мин | | | ДК | АДР/0 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | $v_2$ | $v_3$ | $v_4$ | | |
| Цельный яд | — | Сукцинат | 25 | 75 | 22 | 3,10 | 1,80 |
| | 0,5 | —"— | 30 | 70 | 44 | 1,59 | 1,43 |
| | 1,0 | —"— | 28 | 58 | 45 | 1,28 | 1,40 |
| | — | α-кетоглутарат | 21 | 60 | 20 | 3,00 | 3,20 |
| | 0,5 | —"— | 22 | 46 | 30 | 1,53 | 2,40 |
| | 1,0 | —"— | 22 | 44 | 44 | Полное разобщение | |
| Фракции яда | — | Сукцинат | 21 | 47 | 19 | 2,47 | 1,90 |
| II | 1,75 | —"— | —"— | 54 | 34 | 1,58 | 1,50 |
| III | 3,5 | —"— | —"— | 53 | 53 | Полное разобщение | |
| III | 0,07 | —"— | —"— | 56,5 | 56,5 | | —"— |
| | 0,7 | —"— | —"— | 12,5 | 12,8 | | —"— |
| | 3,5 | —"— | —"— | 2,8 | 2,8 | | —"— |
| IV | 2,3 | —"— | —"— | 64 | 64 | | —"— |
| V | 3,5 | —"— | —"— | 42 | 18,5 | 2,28 | 1,89 |
| | 7,0 | —"— | —"— | 41 | 26 | 1,56 | 1,58 |
| | 10,5 | —"— | —"— | 51 | 51 | Полное разобщение | |
| VI | 3,5 | —"— | —"— | 40 | 25,3 | 1,55 | 1,70 |
| | 5,25 | —"— | —"— | 57 | 47 | 1,20 | 1,24 |
| | 7,0 | —"— | —"— | 58,5 | 58,5 | Полное разобщение | |

токсином яда кобры (Юкельсон, Красильников, Ташмухамедов, 1976).

Низкие концентрации (0,5 мкг/мг белка митохондрий) яда шершня не оказывают заметного влияния на скорость окисления сукцината в состояниях 2 и 3, но значительно повышают интенсивность дыхания в состоянии 4. При этом снижаются значения ДК и АДР/О. Увеличение концентрации яда вдвое в еще большей степени уменьшает ДК, а также скорость окисления в состоянии 2. Аналогичные результаты получены и с α-кетоглутаратом, но эффект яда в этом случае выражен более значительно; при концентрации яда 1 мкг/мг белка митохондрий наступает полное разобщение (табл. 2).

Наиболее сильное действие оказывает фракция III. Даже при концентрации 0,07 мкг/мг белка добавление ее приводит к полному разобщению, а скорость окисления в состоянии 4 значительно увеличивается. В высоких дозах она полностью ингибирует дыхание. Действие фракций II и IV аналогично предыдущему, но проявляется при более высоких концентрациях. Низкомолекулярные фракции V и VI повышают скорость окисления не только в состоянии 4, но и в состоянии 3. При низких концентрациях этих фракций происходит уменьшение ДК при сохранении значения АДР/О, а при высоких наступает полное разобщение, однако ингибирования дыхания при действии фракции VI не наблюдается.

Цельный яд шершня и его фракции II—VII вызывают быстрый разрыв БФМ. Исключением является фракция VI, которая при концентрации 1,5 мкг/мл увеличивает проницаемость БФМ (от $2{,}10^{-9}$ до $5 \cdot 10^{-7}$ $ОМ^{-1-}$ $см^{2}$). Однако и в этом случае разрыв мембран наступает быстро, через 45—50 с.

Таким образом, эффект цельного яда и фракций II—IV в основном обусловлен фосфолипазами; вклад низкомолекулярных компонентов незначителен, и природа их пока не изучена.

Для выделения фосфолипазы А фракции III+IV, которые плохо отделяются друг от друга при первичной гельфильтрации на сефадексе G-50, хроматографировали на колонках с карбоксиметил-целлюлозой (СМ-32). Получено 6 фракций. Фракция С-4, являющаяся основной по выходу белка, оказалась гомогенной при электрофорезе на полиакриламидном геле. Аналогичный результат получен и при электрофорезе на ПААГе в присутствии додецильсульфата натрия и дитиотритола (рис. 3). Этот электрофоретически гомогенный белок снижает оптическую плотность при 925 нм суспензии яичного желтка (рис. 4) аналогично фосфолипазе $А_2$, выделенной из змеиных ядов (Marinetti, 1965), и специфически расщепляет лецитин на свободную жирную кислоту и лизолецитин. Можно сделать вывод, что выделенный нами гомогенный препарат белка является фосфолипазой $А_2$.

При изучении действия фосфолипазы $А_2$ яда V. orientalis на мембраны установлено, что этот фермент вызывает деструкцию биомембран (эритроциты, митохондрии) и разрыв БФМ. Во всех случаях она действует в значительно более низких концентрациях по сравнению с фосфолипазой $А_2$, выделенной из других ядов, в частности, из яда среднеазиатской кобры и пчелы (Туйчибаев и др., 1976, 1977).

Молекулярный вес фосфолипазы $А_2$ яда шершня, определенный методом гельфильтрации на сефадексе G-75 и электрофорезом на ПААГе в присутствии 1% додецильсульфата натрия, равен примерно 26000. Однако фосфолипазы $А_2$, выделенные из ядов различного происхождения, имеют молекулярные веса почти всегда ниже 15000 (Брокерхоф, Дженсен, 1978). Некоторые исключения из этого правила объясняются тем, что мономерные ферменты из Crotalus имеют обычно низкий молекулярный вес, но стабиль-

ной формой очищенного фермента является димер (Wells, 1971; Hachimori, 1971). В пчелином яде димер присутствует только в концентрированных растворах при щелочных значениях pH. Сравнительно высокий молекулярный вес мономера объясняется наличием в ферменте около 23% углеводного компонента (Shipolini et al., 1971 a). Высокие молекулярные веса некоторых фосфолипаз $A_2$ из ядов Naja naja и Vipera russellii, безусловно, представляют исключение (Salach et al., 1971). В нашем случае в молекуле фосфолипазы $A_2$ шершня при качественном анализе углеводный компонент не обнаружен.

Рис. 3. Электрофореграмма цельного яда, фракции III и фосфолипазы $A_2$ шершня.

1 — цельный яд, 2 — фракции III+IV, 3 — фосфолипаза $A_2$, 4 — фосфолипаза $A_2$ в присутствии 1% додецильсульфата натрия в геле.

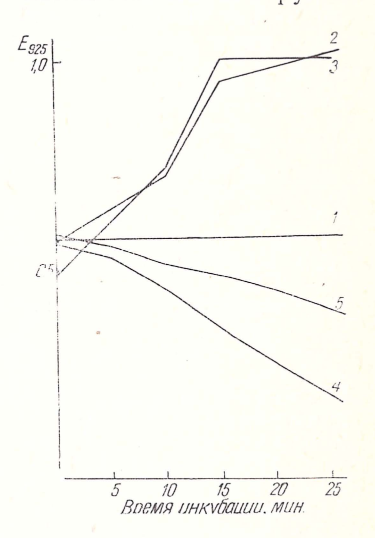



Рис. 4. Действие цельного яда, фракции III и фосфолипазы $A_2$ на суспензию яичного желтка.

1 — контроль, 2 — цельный яд, 3 — фракция III, 4 — фосфолипаза $A_2$ шершня (V. orientalis), 5 — фосфолипаза $A_2$ кобры (N. N. oxiana).

По нашим предварительным данным, в яде шершня, помимо фосфолипазы $A_2$, содержится другой фермент — лизофосфолипаза $A_1$. Так, при использовании метода Marinetti (1965) измерения активности для цельного яда и фракции III получаются необычные кривые при измерении фосфолипазной активности: вместо снижения оптической плотности, что обычно происходит при добавлении истинной фосфолипазы $A_2$ (рис. 6, кривые 4 и 5), наблю-

дается ее возрастание (рис. 6, кривые 2, 3). Это можно объяснить, лишь предположив, что в ходе реакции лизолецитин при ферментативном расщеплении лецитина подвергается дальнейшему распаду до образования свободных жирных кислот и глицеро-3-фосфохолина. Появление большого количества жирных кислот, которые, как известно, образуют агрегаты в растворе, содержащем 0,9% NaCl (условия измерения активности по Marinetti), приводит к увеличению светорассеяния системы. Действительно, с помощью метода тонкослойной хроматографии конечных продуктов реакции было определено, что цельный яд и фракция III могут ускорять гидролиз как лецитина, так и лизолецитина. В обоих случаях при полном гидролизе продуктами реакции были только свободные жирные кислоты.

Таким образом, из изложенных выше экспериментальных данных следует, что гемолитическая активность яда большого шершня Vespa orientalis обусловлена присутствием в них по меньшей мере двух липолитических ферментов, различающихся своей субстратной специфичностью — фосфолипазы $A_2$ и лизофосфолипазы $A_1$.

## ЛИТЕРАТУРА


Брокерхоф Х., Дженсен Р. 1978. Липолитические ферменты. М.
Гришин Е. В. и др. 1976. «Биоорганическая химия», 2, 1018.
Красильников О. В., Юкельсон Л. Я., Ташмухамедов Б. А. 1976. ХПС, № 1, 127.
Сорокин В. М., Нигматов З., Юкельсон Л. Я. 1972. «Биохимия», 37, 112.
Туйчибаев М. У. и др. 1976. «Биохимия митохондрий», М., 146.
Туйчибаев М. У. и др. 1977. «Биохимия», 42, 2160.
Шкинев А. В. и др. 1978. «Биохимия», 43, 1452.
Юкельсон Л. Я. и др. 1975. «Биохимия», 40, 698.
Юкельсон Л. Я., Красильников О. В., Ташмухамедов Б. А. 1976. ХПС, № 1, 128.
Bhoola K. D., Calle J., Schachter M. 1961. J. Physiol., 159, 167.
Breithaupt H., Habermann E. 1968. Naunyn—Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmacol., 261, 252.
Calle Waert G., Shipolini R., Vernon C. A. 1968, Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett., I, III.
Carlsson F. H. H. 1974. Biochem, Biophys. Res. Commun.. 59, 269.
Catterall W. A. 1975. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 1782.
Chandeux J. R., Kasai M., Lee Ch. — Y. 1970, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 67, 1241.
Condrea E., de Vries A. 1965, Toxicon, 2, 261.
Condrea E., Barzilav M., Mager J. 1970. BBA, 210, 65.
Dorman L. C., Markley L. D. 1971. J. Med. Chem., 14, 5.
Edery J. et al. 1972. Toxicon, 10, 13.
Fischl J. et al. 1972. Acta parmacol et toxicol., 31, 65.
Fredholm B. 1966. Biochem, Phormacol., 15, 2037.
Gauldie J. et al., 1976, Eur J. Biochem., 61, 369.
Geller R. G. et al. 1974. FEBS Lett., 48, 179.
Hebermann E. 1954a. Naunyn—Schiniedebergs Arch. Exp. Pathol, Pharmacol., 222, 173.
Habermann E. 1954b. Naturwissenschaffen, 41, 429.

Habermann E. 1957. Biochem. Z., **329**, 1.
Habermann E. 1972. Science, **177**, 314.
Habermann E. 1974. Pharm. Unserer Zeit., 3, 145.
Habermann E., Reiz K. G. 1964. Naturwissenschaften, **51**, 61.
Habermann E., Reiz K. G. 1965a. Biochem. Z., **341**, 451.
Habermann E., Reiz K. G. 1965b. Naturwissenschaften, **343**, 192.
Habermann E., Jentsch J. 1967. Hoppe—Seyler's Z. Physiol. Chem., **348**, 37.
Habermann E., Kowallek H. 1970. Hopp—Seyler's Z. Physiol. Chem., **351**, 884.
Hashimori Y., Wells M. A., Hanahan D. J., 1971. Biochemistry, **11**, 4084.
Haux P. Hoppe—Seyler's L. Physiol. Chem., **350**, 536.
Haux P., Sawerthal H., Habermann E. 1967. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **348**, 737.
Isay J., Nadber E. Z., Gitter S. 1973. Acta Pharmacol et toxicol., **33**, 157.
Jagues R., Schachter M. 1954. Brit. J. Pharmacol., **9**, 53.
Joubert F. J. 1975. Hoppe—Seyler's Z. Physiol. Chem., **356**, 53.
Kaplinsky E., Isay J., Gitter S. 1974. Texicon, **12**, 69.
Kreil G. 1973. FEBS Lett., **33**, 241.
Kreil G., Kreil-Kiss G. 1967. Biochem. Biophys. Res. Communs, **27**, 275.
Krysteva M. A. et al. 1973. Докл. Болг. АН, **26**, 917.
Louw A. J. 1974a. Biochem. Biophys. Res. Communs, **58**, 1022.
Louw A. J. 1974b. BBA, **336**, 481.
Lowy P. H., Sarmiento L., Mitchell H. K. 1971. Arch. Biochem., **145**, 338.
Liibke K., Matthes S., Kloss G. 1971. Experientia, **27**, 765.
Marinetti G. V. 1965. BBA, **98**, 554.
Marr A. G., Bexter B. H. 1974, Texicon, **12**, 443.
Mebs D. 1970. Int. J. Biochem, **1**, 335.
Meldrum B. S. 1965. Pharmacol. Rev., **17**, 393.
Miledi R., Molinoff P., Potter L. T. 1971. Nature **229**, 554.
Narahashi T. 1975. 6th Congr. Pharmacol., Helsinki, 1975, Abstrs, **1**, 214.
Neumann W., Habermann E. 1954. Naunyn—Schiniedebergs Arch. Exo. Pat. Hol. Pharmacol., **222**, 367.
O'Conner R., Rassubrook W. 1963. Canad. J. Biochem. and Physiol., **41**, 1943.
Olson E. C., Munjal G., Malviya A. N. 1974. Toxicon, **12**, 419.
Owen M. D. 1971. Experientia, **27**, 544.
Romey G. et al. 1975. Biochem. Biophys. Res. Communs, **64**, 115.
Russell F. E. 1967. Feder. Proceed., **26**, 1206.
Salach J. I. et al. 1971. J; Biol. Chem., **246**, 331.
Sandbank U. et al. 1973. Acta Pharmacol. et Toxicol., **33**, 442.
Schachter M. 1963. Ann. N. Y. Acad. Sci, **164**, 108.
Schroder E. et al. 1971. Experienta, **27**, 764.
Sessa G. et al. 1969. J. Biol. Chem., **244**, 3575.
Shipolini R. A. et al. 1967. Chem. Commun., **1967**, 679.
Shipolini R. A. et al. 1971a. Eur. J. Biochem., **20**, 459.
Shipolini R. A. et al. 1971b, FEBS Lett, **17**, 59.
Slotta K. H., Vick J. A. 1969. Texicon, **6**, 167.
Takechi M., Hayashi K., Sasali T. 1972. Mol. Pharmacol., **8**, 446.
Van Deenen L. L. M., de Haas G. H. 1966. Ann. Rev. Biochem, **35**, 157..
Wells M. A. 1971. Biochemistry, **10**, 4078.
Zlotkin E. et al. 1972. Toxicon, **10**, 207.
Zlotkin E. et al. 1972b. Toxicon, **10**, 211.
Zlotkin E. et al. 1975 Insect Biochem., **5**, 243.

Н. М. МИРСАЛИХОВА

# ФОСФОЛИПАЗЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ Na, К-АТФазы МЕМБРАН

Транспорт ионов против градиента концентраций через клеточные мембраны имеет первостепенное значение в связи с его участием в биологически важных процессах. Огромный прогресс в понимании этого процесса был достигнут благодаря открытию Skou (1957) в микросомальной фракции нервов краба $Na^+$, $K^+$-АТФазы, от которой зависит ионная асимметрия.

К настоящему времени собран богатый материал о тканевой и субклеточной локализации этого фермента, молекулярной организации, функциональной роли белок-липидного взаимодействия, очистке, реконструкции на бислойных мембранах, роли липидного окружения в проявлении активности и др. (Кирсенко, 1971, 1976; Ташмухамедов, Гагельганс, 1973; Dahl, Hokin, 1974; Tanaka, 1974; Schwartz et al., 1975; Рожманова, 1976; Korenbrot, 1977; Болдырев, Твердислов, 1978; Robinson, Flashner, 1979; Болдырев, 1979). Дальнейшее исследование механизмов работы $Na^+$, $K^+$-АТФазы позволит активно вмешиваться в эти процессы и управлять ими.

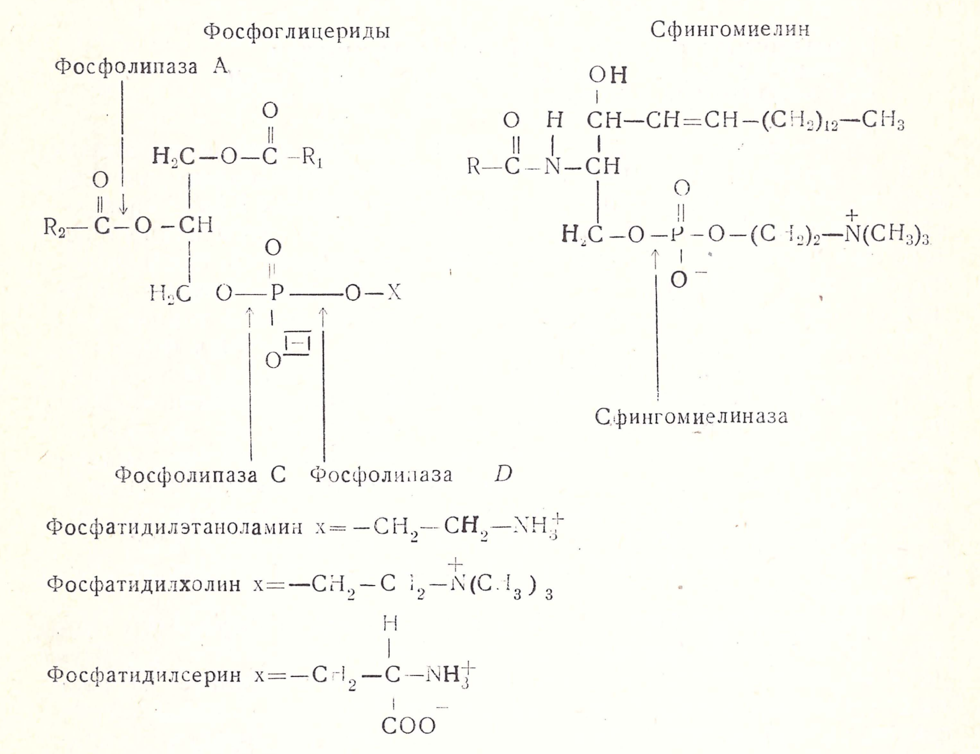
$Na^+$, $K^+$-АТФаза — мембранный липопротеидный фермент, для проявления активности которого необходимы липиды. Используя фосфолипазы в качестве инструмента исследования, можно дать ценную информацию о роли фосфолипидов в функционировании транспортной АТФазы (Мирсалихова, 1969; Roelofsen et al., 1973; Dahl, Hokin, 1974; Tanaka, 1974; Мирсалихова и др., 1975; Мирсалихова, Рахимов, 1977; Болдырев, 1979; Isern de Caldentey, Wheeler, 1979). По сравнению с опытами по реконструкции делипидированной с помощью органических растворителей ферментной системы этот метод обладает тем преимуществом, что позволяет изучать кинетику инактивации $Na^+$, $K^+$-АТФазы без полного разрушения тонкой структуры мембран. Кроме того, используя субстратную специфичность фосфолипаз, можно изучать роль отдельных специфических фосфолипидов в функционировании $Na^+$, $K^+$-АТФазы.

## ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О МОДЕЛИ МЕМБРАНЫ И О РАСЩЕПЛЕНИИ ФОСФОЛИПИДОВ РАЗЛИЧНЫМИ ФОСФОЛИПАЗАМИ

Согласно современным представлениям, в модели мозаичной мембраны фосфолипиды организованы в виде двойного слоя с трансверсальным расположением жирнокислотных цепочек и довольно плотной упаковкой бислоя за счет полярных кислых фосфолипидов. Периферические белки расположены на одной из поверхностей бислоя с незначительным в него погружением, интегральные пронизывают мембрану насквозь. Эта модель предусматривает возможность образования олигомеров, переходы белков и

липидов из одного слоя в другой, вращательную подвижность, перемещение белков в латеральном направлении и т. д. Липидный бислой несимметричен, характеризуется неодинаковым составом. Большая часть липидных молекул не связана с белками, хотя некоторые входят в состав липопротеинов (Kabak et. al., 1975; Kotyk, 1977).

Ниже представлено взаимодействие фосфолипидов с фосфолипазами А, С, D и сфингомиелиназой.




Фосфолипаза $A_2$ (фосфатил-ацилгидролаза, КФ 3.1.1.4.) найдена в ядах змей, пчел и ос, а также в некоторых тканях животных; известны случаи определения их в растениях и бактериях. Она расщепляет ~80—90% всех мембранных фосфолипидов, отщепляет жирную кислоту в положении 2 и приводит к образованию лизосоединений.

Фосфолипаза С (фосфатидилхолин-холинфосфогидролаза, КФ 3.1.4.3.) из Bacillus cereus и Clostridium welchii способствует гидролизу связей между L — α-фосфатидной кислотой и азотистым основанием, наблюдается расщепление ~ 80—90% фосфолипидов до диглицеридов и церамидов, которые остаются в мембране, в то время как хорошо растворимые этаноламинфосфат и серинфосфат удаляются из нее.

Фосфолипаза *D* (фосфатидилхолин-фосфатидогидролаза, КФ.3. 1.4.4.) гидролизует 70% фосфатидилхолина до холина и фосфатидной кислоты между α, β-диглицеридом и фосфорилированным основанием.

Сфингомиелиназа (сфингомиелин-холинфосфогидролаза) расщепляет сфингомиелин. Холинфосфат, образующийся под действием этого фермента, хорошо растворим в воде и удаляется из мембраны, диглицериды и церамиды остаются.

### ПРИМЕНЕНИЕ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ФОСФОЛИПАЗ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ТОПОГРАФИИ ФОСФОЛИПИДОВ В АТФазе

Для правильного представления о молекулярной организации и функционировании $Na^+$, $K^+$-АТФазы необходимо изучить локализацию составляющих ее компонентов. $Na^+$, $K^+$-АТФаза — один из наиболее изученных препаратов среди ферментных систем, для проявления активности которых необходимы фосфолипиды. Однако до сих пор нет единого мнения о том, с каким липидом связан этот фермент. Результаты работ по исследованию роли белок-липидного взаимодействия с помощью различных фосфолипаз, к сожалению, не идентичны из-за использования фосфолипаз из различных источников, а также применения неочищенных препаратов. Получению более или менее однозначных результатов способствовало успешное применение в последнее время высокоочищенных препаратов фосфолипаз. Кроме того, эксперименты с использованием фосфолипаз дают нередко противоречивые данные из-за нестандартных условий экспериментов. При этом следует учитывать по крайней мере 4 важных фактора (Цваал, Роелофсен, 1979).

1. При подборе фосфолипаз для исследования ферментов следует принимать во внимание прежде всего особенности их субстратной специфичности, так как идентичные фосфолипазы из разных источников различаются по скорости гидролиза одних и тех же фосфолипидов. Важно также учитывать свойства продуктов гидролиза, образующихся под действием фосфолипаз, которые сами по себе могут обладать мембраноактивным действием.

2. Неравномерность распределения фосфолипидов между внутренней и наружной поверхностями мембраны также играет существенную роль при действии фосфолипаз. Необходимо работать с мембранами всецело замкнутыми или незамкнутыми. В случае смеси этих двух типов могут быть получены противоречивые данные.

3. Следует учитывать компактность липидного слоя мембраны.

4. В биомембрану, кроме липидов, включены и белки, которые могут влиять на скорость гидролиза липидов фосфолипазами, экранируя их. Возможны 2 варианта экранирования: а) белки непосредственно связаны с липидом; б) при отсутствии непосредст-

венного контакта с липидами белки из-за определенного расположения мешают их контакту с фосфолипазами.

С учетом этих факторов при использовании различных фосфолипаз исследовано расположение фосфолипидов в препаратах мембран эритроцитов (рис. 1). Если исходить из предположений, что липиды представлены в мембране двойным слоем, то в состав внешнего слоя мембран эритроцитов человека входят 2 основных холинсодержащих фосфолипида (фосфатидилхолин и сфингомиелин), а фосфатидилэтаноламин составляет 1/5 общего количества. Внутренний слой представлен фосфатидилэтаноламином и фосфатидилсерином со следовыми количествами холинсодержащих фосфолипидов (Цваал, Роелофсен, 1979).

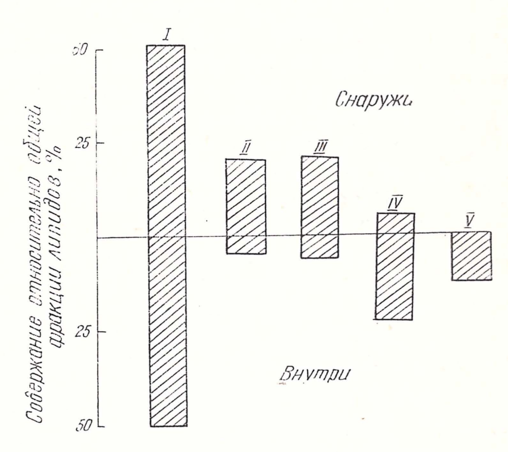



Рис. 1. Возможное нахождение фосфолипидов между внутренней и наружной поверхностями мембран эритроцитов человека (Цваал, Роелофсен, 1979).

*I* — суммарная фракция фосфолипидов, *II* — сфингомиелин, *III* — фосфатидилхолин, *IV* — фосфатидилэтаноламин, *V* — фосфатидилсерин.

С помощью фосфолипазы $A_2$ из яда Naja naja на субклеточных фракциях мембран печени крыс (микросомы, мембраны Гольджи, внутренние митохондриальные и ядерные мембраны) исследована трансмембранная асимметрия фосфолипидов (Nallsson, Dallner, 1977). Обнаружено, что фосфатидилхолин, сфингомиелин и кардиолипин находятся на внутренней поверхности везикул, образованных мембранными фрагментами.

Действие фосфолипаз обусловлено поверхностным натяжением (Цваал, Роелофсен, 1979). Как правило, фосфолипазы должны обладать определенным оптимумом поверхностного натяжения для проявления максимальной активности и, следовательно, скорость гидролиза липидов определяется плотностью их упаковки.

Chap et al. (1977) на свиных и человеческих интактных тромбоцитах с помощью фосфолипаз (фосфолипаза $A_2$, фосфолипаза С, сфингомиелиназа) обнаружили, что липиды на наружной поверхности мембран упакованы с поверхностным натяжением 34 дин/см$^2$ и содержат 46% фосфолипидов плазматических мембран (91% сфингомиелина, 40 лецитина, 34 фосфатидилэтаноламина и менее 6% фосфатидилсерина). Кроме того, фосфолипазы использовали для исследования топографии фосфолипидных везикул (Sundler et al., 1978), состоящих из фосфатидилэтаноламина и фосфатидилхолина. Обнаружено, что фосфолипаза $A_2$ из яда Naja naja, crotalusatrax и Bungarus multicinetus гидролизует до

лизофосфолипидов и жирных кислот около 80% фосфолипидов на внешней поверхности липосом, не проникая во внутренний слой. Фосфолипаза C из Bacillus cereus, Clostridium welchii и фосфолипаза *D* из арахиса расщепляют фосфолипиды на обеих поверхностях липосом.

В связи с тем, что работа натриевого насоса непосредственно связана с обеими поверхностями мембраны, необходимо иметь представление о пространственной локализации активных центров фермента. В настоящее время существуют доказательства того, что $Na^+$, $K^+$-АТФаза «пронизывает» мембраны. В свое время Kepner, Macey (1968), основываясь на данных молекулярного веса $Na^+$, $K^+$-АТФазы из мембран эритроцитов, высказали предположение, что ее размер соответствует 8,5 нм, в то время, как Kyte (1971), основываясь на молекулярном весе большой субъединицы $Na^+$, $K^+$-АТФазы почки 98 000, оценил ее размер в 3,5—4,0 нм. Deguchi et al. (1977) при изучении субъединиц $Na^+$, $K^+$-АТФазы из почек с помощью электронной микроскопии с негативным контрастированием обнаруживали, что препараты представляют собой дископодобные фрагменты мембран с внутримембранными частицами диаметром 4,0—5,0 нм.

Иммунологические работы показали наличие на внутренней поверхности мембраны основного количества антигенных мест в большом пептиде (Kyte, 1974). Изучая действие антител разных полипептидов на функцию $Na^+$-насоса, удалось определить локализацию субъединиц в мембране (Jean, Albers, 1977). Малая субъединица, ответственная за связывание оуабаина, расположена на внешней поверхности, а большая, ответственная за фосфорилирование,— на внутренней поверхности мембраны. Это согласуется с данными многих авторов по специфическому фосфорилированию именно большой цепи (Uesugi et al., 1971; Kyte, 1971; Hart, Titus, 1973) и локализации в ней субстратного центра и $Na^+$-связывающих участков.

С помощью фосфолипаз удалось показать наличие фосфатидилсерина и активного центра $Na^+$, $K^+$-АТФазы на внутренней поверхности мембраны эритроцитов. Для мембраносвязанной $Na^+$, $K^+$-АТФазы характерна несимметричность расположения липида; с внешней стороны мембраны расположены преимущественно фосфатидилхолин, сфингомиелин и холестерин, а с внутренней — фосфатидилсерин и фосфатидилэтаноламин (Emmelot, 1977; Nalsson, Dallner, 1977).

При правильной оценке данных субстратной специфичности фосфолипаз и ферментативной активности АТФаз можно определить необходимость тех или иных фосфолипидов для работы фермента.

Roelofsen, van Deenen (1973), используя эту корреляцию с помощью фосфолипаз $A_2$, C и сфингомиелиназы, показали необходимость фосфатидилсерина для проявления $Na^+$, $K^+$-АТФазной активности из мембран эритроцитов. Для этой цели тени эритро-

цитов человека обрабатывали различными фосфолипазами с последующим определением гидролиза фосфолипидов, выраженных в % к контролю, и $Na^+$, $K^+$-АТФазной активности из мембран эритроцитов.

| *Фермент* | *Число опытов* | *Сфингомиелин* | *Фосфатидилхолин* | *Фосфатидилэтаноламин* | *Фосфатидилсерин* | *АТФазная активность* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Панкреатическая фосфолипаза $A_2$ | 12 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Фосфолипаза C (B. cereus) | 19 | 100 | 0 | 0 | 0—5 | 0 |
| Сфингомиелиназа (S. aureus) | 3 | 0 | 100 | 100 | 100 | 120—140 |

Таким образом, панкреатическая фосфолипаза $A_2$ и фосфолипаза C из Bacillus cereus инактивируют $Na^+$, $K^+$-АТФазу; сфингомиелиназа, которая расщепляет только сфингомиелин, не ингибирует транспортный фермент. Следовательно, при полном расщеплении фосфолипидов (фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин) наблюдается инактивация ферментативной активности. Для определения потребности транспортного фермента в индивидуальных фосфолипидах после обработки фосфолипазой C из Bacillus cereus и удаления образовавшихся диглицеридов $Na^+$, $K^+$-АТФазу реактивировали фосфолипидами. Установлено восстановление активности после добавления фосфатидилсерина и ее отсутствие после добавок фосфатидилхолина. В случае обработки мембран эритроцитов фосфатидилсериндекарбоксилазой из E. coli наблюдается инактивация $Na^+$, $K^+$-АТФазы за счет превращения фосфатидилсерина в фосфатидилэтаноламин (Roelofsen, van Deenen, 1973; Цваал, Роелофсен, 1979).

Необходимость фосфатидилсерина для проявления активности транспортного фермента подтверждают также данные, полученные на $Na^+$, $K^+$-АТФазе из мембран эритроцитов и мозга после обработки фосфолипазой *D* (Roelofsen, van Deenen, 1973; Мирсалихова, Рахимов, 1977; Рахимов и др., 1978).

На рис. 2 показаны результаты модельных опытов по гидролизу очищенных фосфолипидов фосфолипазой $A_2$ из яда кобры Naja naja oxiana и фосфолипазой *D* из семян хлопчатника в сравнимых условиях (Мирсалихова, Рахимов, 1977). Показано, что фосфолипаза $A_2$ яда кобры расщепляет все 3 подобранных для опыта фосфолипида (фосфатидилсерин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилхолин). С наибольшей скоростью расщепляется фосфатидилсерин, затем фосфатидилэтаноламин, и уже с меньшей скоростью — фосфатидилхолин. Фосфалипаза *D* из семян хлопчатника, в отличие от фосфолипазы $A_2$, с наибольшей скоростью гидролизует лецитин, с меньшей — фосфатидилэтаноламин, а фосфатидилсерин даже в течение 5 ч гидролизуется только на 10% (рис. 2). Несколько другой эффект обнаружен при исследовании

субстратной специфичности фосфолипазы $D$ из арахиса и капусты (рис. 3). В этом случае наблюдалось значительное расщепление фосфатидилсерина, фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина.

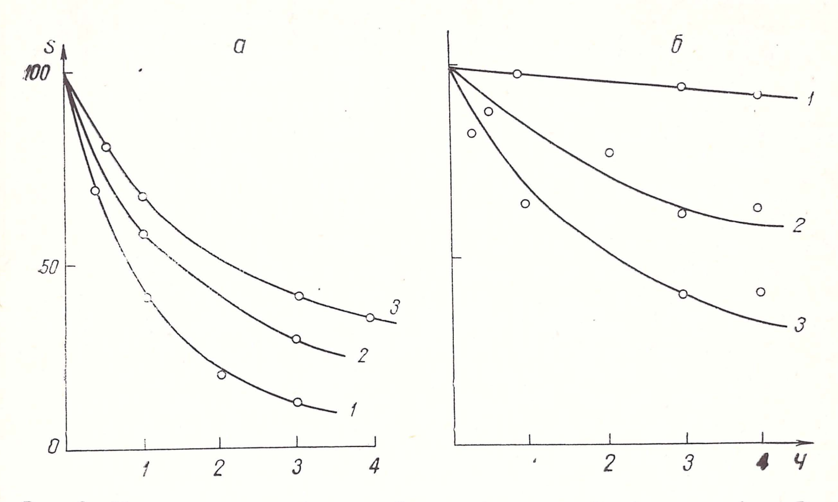



Рис. 2. Исследование субстратной специфичности фосфолипаз $A_2$ и $D$.

*а*—фосфолипаза $A_2$, *б*—фосфолипаза $D$; *1*—фосфатидилсерин, *2*—фосфатидилэтаноламин, *3*—фосфатидилхолин; S—негидролизованный субстрат. Концентрация фосфолипазы $A_2$—$1 \cdot 10^{-5}$ М, фосфолипазы $D$—$5{,}6 \cdot 10^{-5}$ М.

Активирующий эффект фосфолипазы $D$ из семян хлопчатника в концентрации $5 \cdot 10^{-6}$ М на $Na^+$, $K^+$-АТФазу из микросом мозга

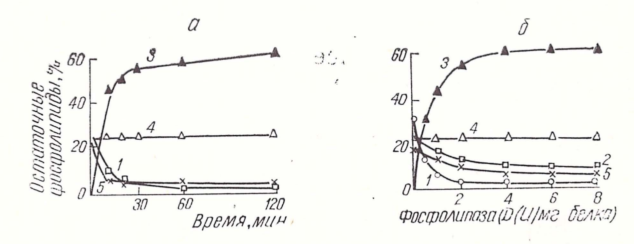
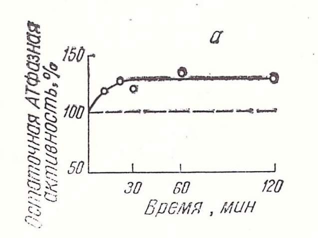



Рис. 3. Исследование субстратной специфичности фосфолипазы D из арахиса (*а*) и капусты (*б*) (Roelofsen et al,. 1973).

*1*—фосфатидилхолин, *2*—фосфатидилэтаноламин, *3*—фосфатидная кислота, *4*—сфингомиелин, *5*—фосфатидилсерин.

составляет 125%, почек свиньи — 138%. Ингибирующее влияние фосфолипазы $A_2$ при концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ М на $Na^+$, $K^+$-АТФазу из мозга быка составляет 56%, а на очищенную $Na^+$, $K^+$-АТФазу ($\sim 90\%$ чистоты по белку) из мозгового слоя почек свиньи — 57,3%.

Активирующий эффект фосфолипазы *D*, возможно, объясняется тремя причинами: 1) появление фосфатидиловой кислоты приводит к возникновению отрицательных зарядов на поверхности мембран (при этом происходит разрыхление мембран) и увеличению гидрофобного объема; «разрыхление» системы фосфолипазой *D* улучшает диффузию одновалентных катионов; 2) фосфатидиловая кислота — продукт распада фосфолипидов — обладает активирующим действием за счет детергентных свойств; 3) фосфолипаза *D* из семян хлопчатника расщепляет фосфатидилсерин, необходимый для проявления активности $Na^+$, $K^+$-АТФазы, с незначительной скоростью. Активирующий эффект фосфолипазы *D* проявляется независимо от внутривидовой специфичности фосфо-



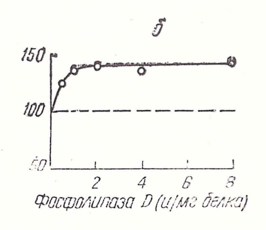



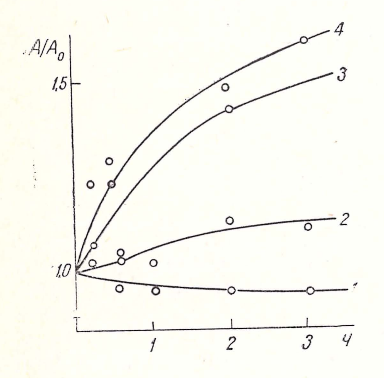

Рис. 4. Активность $Na^+$, $K^+$-АТФазы мембран теней эритроцитов после обработки фосфолипазой *D* из арахиса (*а*) и капусты (*б*) (Roelofsen et al., 1973).

липидов в различных тканях в мембранах эритроцитов (Roelofsen et al., 1973) (рис. 4), микросомах мозга (Мирсалихова, Рахимов, 1977; Рахимов, и др., 1978; Болдырев, Твердислов, 1978) и в очищенной $Na^+$, $K^+$-АТФазе (~90% чистоты по белку) из мозгового слоя почек свиней. При сравнении данных, полученных после обработки фосфолипазами *D* из различных источников, обнаружена наилучшая активация при обработке $Na^+$, $K^+$-АТФазы из микросом мозга фосфолипазой *D* из семян хлопчатника (рис. 5), которая возрастает во времени. Этот эффект, возможно, объясняется сохранением фосфатидилсерина (см. рис. 2) и подтверждается данными Roelofsen et al. (1973) об уменьшении активирующего эффекта фосфолипазы *D* при снижении уровня фосфатидилсерина. Кроме того, исследования Roelofsen et al. (1971) на мембранах человеческих эритроцитов показали отсутствие инактивации $Na^+$, $K^+$-АТФазной активности после удаления эфиром слабосвязанных фосфолипидов, включающих 25% фосфатидилсерина. Однако инактивация наблюдалась после удаления прочносвязанных липидов более полярными растворителями.

Следовательно, ингибирование наблюдается при удалении прочносвязанных фосфолипидов, которые экранированы ферментом благодаря его определенному расположению. Белки транспортного фермента, по-видимому, могут тормозить ферментатив-

ное расщепление липида не только за счет его экранирования, но и благодаря конкуренции $Na^+$, $K^+$-АТФазы с фосфолипазами за фосфолипиды, с которыми они образуют комплекс. В результате разрушения этих фосфолипидов сильными органическими растворителями нарушается белок-белковое и белок-липидное взаимодействие и наступает необратимое ингибирование транспортного фермента.

При действии фосфолипазы $A_2$ инактивирующий эффект на $Na^+$, $K^+$-АТФазу из микросом мозга возрастает с увеличением ее концентрации (рис. 6). При сравнении данных, полученных после обработки фосфолипазой $A_2$ $Na^+$, $K^+$-АТФазы из микросом мозга и очищенного препарата фермента из мозгового слоя почек свиней, важно отметить сохранение инактивирующего эффекта неза-



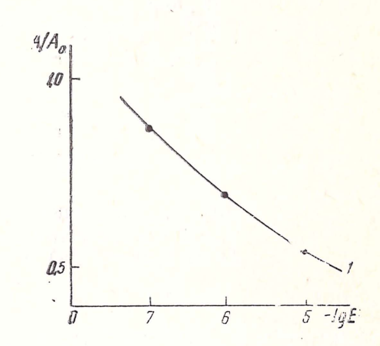




Рис. 5. Действие фосфолипазы *D* из семян хлопчатника на $Na^+$, $K^+$- АТФазу микросом мозга. Среда инкубации: 5 мМ трис-HCl (рН-6,0, температура 20°С).

*1*—в отсутствие фосфолипазы *D*, *2*—фосфолипаза *D*—10 мкг/мг белка микросом, *3*—40 мкг/мг белка, *4*—80 мкг/мг белка; *А*—удельная активность фермента в присутствии $Na^+$, $K^+$- АТФазы, $A_0$—удельная активность в начальный момент.

Рис. 6. Влияние различных концентраций фосфолипазы $A_2$ из яда кобры на $Na^+$, $K^+$-АТФазу микросом мозга. Время инкубации 30 мин, t—37°С.

висимо от источника мембран и чистоты препарата. Это позволяет думать о непосредственном действии фосфолипазы $A_2$ на фосфолипиды $Na^+$, $K^+$-АТФазы.

В связи с тем, что основными компонентами яда кобры, действующими в «синергизме» (Юкельсон и др., 1974), являются фосфолипаза $A_2$ и прямой гемолитический фактор (ПГФ), для нас представляло интерес исследовать отдельное и комбинированное действие этих компонентов. Мы использовали фосфолипазу $A_2$ и ПГФ, полученные в чистом виде из яда среднеазиатской кобры Naja naja oxiana (Сахибов и др., 1970; Юкельсон и др., 1974). Чистоту препарата контролировали электрофоретически.

ПГФ, или цитотоксин,— это полипептид с молекулярным весом 6500 и резко выраженными щелочными свойствами за счет диаминомонокарбоновых и гидрофобных аминокислот (Юкельсон и др., 1974). Благодаря этим особенностям ПГФ может внедряться в мембрану и соответствующим образом изменять ее поверхностный заряд.

Мы исследовали влияние различных концентраций фосфолипазы $A_2$ и ПГФ на $Na^+$, $K^+$-АТФазную активность из микросом мозга.

Фосфолипаза $A_2$ и ПГФ, взятые в отдельности, тормозят $Na^+$, $K^+$-АТФазу в зависимости от концентрации и исследуемого вещества (Мирсалихова, 1969; Мирсалихова, Юкельсон, 1973).

| *Компонент змеиного яда, М* | *АТФазная активность, %* |
|---|---|
| Фосфолипаза $A_2$ | |
| $1\cdot10^{-5}$ | $56\pm2{,}9$ |
| $1\cdot10^{-6}$ | $70\pm3{,}1$ |
| $1\cdot10^{-7}$ | $82\pm5{,}0$ |
| ПГФ | |
| $1\cdot10^{-4}$ | $68\pm4{,}1$ |
| $5\cdot10^{-5}$ | $99\pm8{,}0$ |
| $1\cdot10^{-5}$ | 100 |
| Фосфолипаза $A_2$ $1\cdot10^{-6}$ + ПГФ | |
| $5\cdot10^{-5}$ | $45\pm3{,}5$ |
| $1\cdot10^{-5}$ | $56\pm4{,}1$ |

При высоких концентрациях ПГФ ($1\cdot10^{-4}$ М) наблюдается инактивация $Na^+$, $K^+$-АТФазы на 25—30%. Низкие концентрации в определенной степени даже активируют фермент. При изучении влияния ПГФ в концентрации $1\cdot10^{-7}$ М на ферментативную активность была обнаружена зависимость эффективности действия цитотоксина от взятого в опыт ферментативного препарата (Мирсалихова и др., 1974). Неоднозначность полученных результатов объяснялась различным состоянием его мембранной структуры, в частности величиной мембранных фрагментов. Для контроля влияния полидисперсности ферментного препарата на эффект ПГФ микросомы обрабатывали ультразвуком (15 кГц, 40 Вт, 60 с). При этом наблюдалось снижение исходной активности на 22%, однако активация после обработки ПГФ усиливалась до 32% и стабилизировалась в отличие от не обработанных ультразвуком препаратов, активированных только на 7%. Подобный эффект, возможно, объясняется дезорганизацией фосфолипидной части молекулы (Ташмухамедов, Гагельганс, 1973). Не исключе-

на также конкуренция за участки связывания между одновалентными катионами $Na^+$ и $K^+$ и ПГФ, обладающими характерными поликатионными свойствами. По-видимому, это объясняет его активирующий эффект при низких концентрациях.

В механизме действий ПГФ, возможно, существенную роль играет положительный заряд. Это подтверждают аналогичные данные, полученные с использованием гистонов (Писарева и др., 1970; Писарева, Парфенова, 1973). При совместном действии фосфолипазы $A_2$ и цитотоксина на $Na^+$, $K^+$-АТФазу мембран клеток мозга обнаружен интересный факт усиления инактивации транспортного фермента (Мирсалихова и др. 1974, 1975). Это демонстрирует синергизм фосфолипазы $A_2$ и ПГФ относительно $Na^+$, $K^+$-АТФазы. Позднее идентичные данные были получены Zaheer et al. (1979) на $Na^+$, $K^+$-АТФазе из клеток саркомы Иосиды и головного мозга. Фосфолипаза $A_2$ и цитотоксин были выделены из яда кобры Naja naja. При подпороговых концентрациях (1 мкг/1мл белка) цитотоксин усиливал эффект фосфолипазы $A_2$ (20 мкг белка/мл) на $Na^+$, $K^+$-АТФазу из мозга до 82%, из клеток саркомы — до 100%. Некоторые отличия между этими и нашими данными объясняются, по-видимому, различной удельной активностью использованных цитотоксинов. Если в опытах Zaheer et al. (1979) цитотоксин инактивирует на $\sim$ 40% $Na^+$, $K^+$-АТФазу из мозга при концентрации 1 мкг/мл, то в наших опытах этот эффект получен только при концентрации 650 мкг/мг. Фосфолипазы обладают идентичным действием.

Трудно объяснить собственно инактивирующий эффект фосфолипазы $A_2$ отдельно или совместно с ПГФ. До сих пор неизвестно, происходит ли это за счет нарушения пространственной ориентации фермента в мембране или же за счет действия продуктов распада фосфолипидов (лизосоединений и жирных кислот).

Первые попытки исследовать влияние жирных кислот на $Na^+$, $K^+$-АТФазу предприняты Skou (1965). Автор исследовал жирные кислоты типа олеиновой. Обнаружена инактивация ферментативной активности под действием олеиновой кислоты, стеариновая кислота была неэффективна. При изучении действия жирных кислот с короткой цепью (4—12 С) на $Na^+$, $K^+$-АТФазу мозга наблюдали ингибирование $Na^+$, $K^+$-АТФазной активности, коррелирующее с длиной цепочки жирных кислот. Жирные кислоты с длинной цепью также угнетали $Na^+$, $K^+$-АТФазу мембран мозга (Ahmed, Thomas, 1971) с аналогичной зависимостью от длины углеродной цепи, причем угнетение наиболее выражено у ненасыщенных жирных кислот.

Для выяснения роли жирных кислот в инактивирующем эффекте фосфолипазы $A_2$ из яда кобры Naja naja oxiana мы (Мирсалихова и др., 1975) детально исследовали действие ненасыщенных и насыщенных жирных кислот в концентрациях $1 \cdot 10^{-3}$—$1 \cdot 10^{-5}$ $M$ на $Na^+$, $K^+$-АТФазу из микросомальной фракции мозга быка.

| *Концентрация жирных кислот, М* | *АТФазная активность, % от контроля* |
|---|---|
| Лауриновая ($C_{12}$) | |
| $1 \cdot 10^{-3}$ | $42 \pm 2{,}3$ |
| $5 \cdot 10^{-4}$ | $53 \pm 3{,}2$ |
| $5 \cdot 10^{-5}$ | $70 \pm 2{,}1$ |
| $1 \cdot 10^{-5}$ | $75 \pm 3{,}0$ |
| Миристиновая ($C_{14}$) | |
| $1 \cdot 10^{-3}$ | $45 \pm 3{,}1$ |
| $5 \cdot 10^{-4}$ | $45 \pm 3{,}3$ |
| $5 \cdot 10^{-5}$ | $62 \pm 3{,}5$ |
| $1 \cdot 10^{-5}$ | $87 \pm 4{,}0$ |
| Пальмитиновая ($C_{16}$) | |
| $1 \cdot 10^{-3}$ | $54 \pm 3{,}5$ |
| $5 \cdot 10^{-4}$ | $53 \pm 5{,}1$ |
| $5 \cdot 10^{-5}$ | $63 \pm 2{,}5$ |
| $1 \cdot 10^{-5}$ | $67 \pm 2{,}9$ |
| Стеариновая ($C_{18}$) | |
| $1 \cdot 10^{-3}$ | $43 \pm 3{,}4$ |
| $5 \cdot 10^{-4}$ | $55 \pm 3{,}1$ |
| $5 \cdot 10^{-5}$ | $75 \pm 4{,}1$ |
| $1 \cdot 10^{-5}$ | $77 \pm 2{,}7$ |
| Бегеновая ($C_{22}$) | |
| $1 \cdot 10^{-3}$ | $38 \pm 3{,}4$ |
| $5 \cdot 10^{-4}$ | $51 \pm 4{,}1$ |
| $1 \cdot 10^{-5}$ | $60 \pm 3{,}0$ |
| Олеиновая ($C_{18}$) | |
| $1 \cdot 10^{-3}$ | $45 \pm 4{,}0$ |
| $5 \cdot 10^{-4}$ | $55 \pm 2{,}3$ |
| $5 \cdot 10^{-5}$ | $57 \pm 4{,}0$ |
| $1 \cdot 10^{-5}$ | $67 \pm 3{,}1$ |
| Арахидоновая ($C_{20}$) | |
| $1 \cdot 10^{-3}$ | $51 \pm 3{,}1$ |
| $5 \cdot 10^{-4}$ | $53 \pm 2{,}8$ |
| $5 \cdot 10^{-5}$ | $60 \pm 3{,}2$ |
| $1 \cdot 10^{-5}$ | $80 \pm 4{,}0$ |

Наибольший инактивирующий эффект жирных кислот наблюдался в концентрации $1 \cdot 10^{-3}$—$5 \cdot 10^{-4}$ М. Наиболее сильным ингибитором из исследованных жирных кислот оказалась бегеновая

кислота ($C_{22}$). В отличие от данных Skou (1957), стеариновая кислота вызывала заметную инактивацию фермента. Среди ненасыщенных кислот лучшими ингибиторами оказалась олеиновая кислота, а из полиненасыщенных — арахидоновая. Это соответствует результатам, полученным Miller, Woodhouse (1977) на $Na^+$, $K^+$-АТФазе из сердца крысы. Ингибирование ферментативной активности при концентрации жирных кислот $1 \cdot 10^{-4}$ *М* является обратимым процессом. После их удаления отмыванием активность восстанавливается до 99%, а после второй отмывки — до 116,5% от исходных величин (Miller, Woodhouse, 1977).

Таким образом, инактивирующий эффект жирных кислот, по-видимому, обусловлен нарушением конформации $Na^+$, $K^+$-АТФазы в результате внедрения жирной кислоты в молекулу фермента или за счет воздействия на мембрану клеток, в которую вмонтирован этот фермент.

Ингибирующий эффект проявляется только при достаточно высоких концентрациях жирных кислот. Кроме того, их инактивирующее действие при концентрациях $1 \cdot 10^{-4}$ *М* и ниже является обратимым. По-видимому, в физиологических условиях жирные кислоты не влияют на $Na^+$, $K^+$-АТФазу. Накопление количества жирных кислот, достаточного для ингибирования фермента, происходит в миокарде при ишемической болезни сердца (Miller, Woodhouse, 1977). Возможность регуляции жирными кислотами активности транспортной АТФазы вытекает из наличия в препаратах $Na^+$, $K^+$-АТФазы из миокарда собаки, обработанных предварительно NaJ, фосфолипазы $A_1$, $A_2$ и лизофосфолипазы, которые благодаря деацилированию мембранных фосфолипидов могут принимать участие в регулировании активности транспортного фермента (Weglicki et al., 1972).

При исследовании влияния продуктов гидролиза фосфолипидов, освобождающихся после обработки фосфолипазой $A_2$ препарата $Na^+$, $K^+$-АТФазы, а именно лизосоединений, инактивации ферментативной активности не обнаружено (Hokin, Hexum, 1972).

В наших исследованиях на очищенной $Na^+$, $K^+$-АТФазе из мозгового слоя почек свиней эффект лизосоединений также не был обнаружен.

Несколько иные результаты получены Taugner, Wähler (1974), которые показали, что $Na^+$, $K^+$-АТФаза из мозгового слоя надпочечников после обработки фосфолипазой $A_2$ инактивировалась только после удаления продуктов гидролиза.

Таким образом, инактивирующее действие фосфолипазы $A_2$, по-видимому, является следствием разрушения фосфолипидов, необходимых для проявления чувствительности $Na^+$, $K^+$АТФазы к одновалентным ионам и сердечным гликозидам, при этом какую-то роль, очевидно, играют и жирные кислоты. Вклад лизосоединений в ингибирующий эффект вероятно, несущественный.

Сопоставляя данные по субстратной специфичности и влиянию фосфолипаз $A_2$ и *D* на $Na^+$, $K^+$-АТФазу, можно подтвердить необ-

ходимость определенных количеств фосфатидилсерина для проявления ферментативной активности транспортного фермента. Ранее необходимость в этом фосфолипиде была показана путем восстановления $Na^+$, $K^+$-АТФазы при добавлении фосфатидилсерина к микросомальной фракции, обработанной для делипидизации органическими растворителями или фосфолипазами (Naguchi, Freed, 1971; Кирсенко, 1971, 1976; Walker, Wheeler, 1975; Goodman, Wheeler, 1978; Болдырев, 1979).

Данные по реактивации $Na^+$, $K^+$-АТФазы различными фосфолипидами в литературе противоречивы. Основываясь на большом количестве работ по реактивации $Na^+$, $K^+$-АТФазы, удалось выяснить необходимость для этого процесса холестерина (Duck-Chong,

Таблица 1

**Влияние обработки фосфолипазой $A_2$ на $Na^+$, $K^+$-АТФазу из микросомальной фракции почек кролика (по Mandersloot et al., 1978)**

| Эксперимент | Остаточный фосфолипид, % к контролю | | | | | | $Na^+$, $K^+$-АТФазная активность, мк Моль $P_{неорг}$/мг белка/1 ч. | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | общие фосфолипиды | сфингомиелин | фосфатидилхолин | фосфатидилэтаноламин | фосфатидилсерин | фосфатидилинозитол | контроль | опыт |
| 1 | 44 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 22,6 | —0,7 |
| 2 | 51 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 21,2 | 2,1 |
| 3 | 62 | 100 | 81 | 16 | 35 | 0 | 27,8 | 0,4 |
| 4 | 74 | 100 | 48 | 0 | 100 | 0 | 20,0 | 1,6 |

1976), сфингомиелина и фосфатидной кислоты (Stahl, 1973), фосфатидилхолина (Hilden, Hokin, 1976). Большинство работ посвящено реактивации фосфатидилсерином (Goodmann, Wheeler, 1978; Palatini et al., 1977; Stahl, 1973). Некоторые авторы приписывают фосфатидилсерину роль специфического участника белок-липидного комплекса транспортного фермента. Однако есть данные, указывающие на отсутствие активирующего эффекта фосфатидилсерина на $Na^+$, $K^+$-АТФазу из почек, обработанную предварительно лубролом (Sood et al., 1972).

Расхождение данных, по-видимому, объясняется методическими трудностями. При удалении липидов, вероятно, происходят необратимые изменения белковой молекулы фермента за счет трудноудаляемых продуктов липолиза, или же фермент по каким-то причинам не может встроиться в мицеллы добавляемого липида. Селективная обработка микросом мозга (De Pont et al., 1973), очищенного фермента из мозгового слоя почек свиньи (De Pont et al., 1978), а также $Na^+$, $K^+$-АТФазы из микросомальной фракции почек кролика (Mandersloot et al., 1978) различными фосфолипазами опровергает необходимость присутствия фосфатидилсерина для каталитической активности $Na^+$, $K^+$-АТФазы. В табл. 1

и 2 представлен сравнительный анализ литературных данных по фосфолипидному составу и ферментативной активности препарата в зависимости от обработки фосфолипазами.

Таблица 2

**Влияние обработок фосфолипазами на фосфолипидное содержание и активность очищенной $Na^+$, $K^+$-АТФазы из наружной медуллы почек кролика (по De Pont et al., 1978)**

| Фермент | % общих фосфолипидов в необработанных препаратах | | | | | $Na^+$, $K^+$-АТФазная активность |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | сфингомиелин | фосфатидилхолин | фосфатидилсерин | фосфатидилинозитол | фосфатидилэтаноламин | |
| 1. Контроль | 17,9±0,6 | 35,6±0,7 | 13,1±0,9 | 5,5±0,3 | 27,9±1,0 | 100 |
| 2. Фосфатидилсериндекарбоксилаза | 18 0±1,6 | 39,0±0,8 | 0,0±0,0 | 5,1±0,3 | 37,7±2,0 | 8/ ±6,8 |
| 3. Фосфатидилинозитолспецифическая фосфолипаза | 17,2±0,9 | 37,3±1,4 | 10,8±0,7 | 0,0±0,5 | 27,8±1,4 | 101 ±2,8 |
| 4. Фосфолипаза С (Clostridium Welchii) | 6,5±0,6 | 1,7±0,2 | 12,7±1,0 | 6,6±0,4 | 9,6±0,8 | 80±5,6 |
| 5. Фосфатидилинозитолспецифическая фосфолипаза С+фосфолипаза С (Clostridium Welchii) | 9,0±1,7 | 2,8±1,2 | 15,7±1,2 | 0,2±0,4 | 5,9±1,0 | 82±6,1 |
| 6. Фосфолипаза С (Clostridium Welchii) | 6,5±0,6 | 1,7±0,2 | 12,7±1,0 | 6,6±0,4 | 9,6±0,8 | 100 |
| 7. Фосфолипаза С (Clostridium Welchii)—фосфатидилсериндекарбоксилаза | 6,6±0,7 | 3,1±0,9 | 0,2±0,2 | 9±0,7 | 20:1±2,0 | 90±14,5 |
| 8. Фосфатидилинозитолспецифическая фосфолипаза С | 17,2±0,9 | 37,3±1,4 | 10,8±0,7 | 0,0±0,5 | 27,8±4 | 100 |
| 9. Фосфатидилинозитолспецифическая фосфолипаза С+фосфатидилсериндекарбоксилаза | 18,9±0,9 | 39,0±1,5 | 0,6±0,5 | 0,2±0 3 | 36,3±1,2 | 56±2,4 |

Примечание. Для вариантов 1—5 $Na^+$, $K^+$-АТФазная активность дана в процентах к контролю, для 6—9—в процентах к фосфолипазе (обработка препарата).

Как следует из табл. 1 (эксперименты 1 и 2), после обработки микросомальных мембран панкреатической фосфолипазой $A_2$ свиньи происходит заметное разрушение глицерофосфолипидов

и одновременная инактивация $Na^+$, $K^+$-АТФазы, а в экспериментах 3 и 4 полная инактивация наблюдалась даже при большом количестве остаточного фосфатидилсерина. Это противоречит данным Roelofsen (1973), полученным на тенях эритроцитов, где после обработки фосфолипазой С из Clostridium welchii наблюдалось сохранение фосфатидилсерина и не происходило инактивации $Na^+$, $K^+$-АТФазы. Это согласуется с данными De Pont et al., (1978), полученными в результате обработок фосфолипазами $Na^+$, $K^+$-АТФазы (табл. 2).

Обработка очищенных препаратов $Na^+$, $K^+$-АТФаз из медуллы почек кролика фосфатидилсериндекарбоксилазой при полном превращении фосфатидилсерина в фосфатидилэтаноламин не вызывала заметного снижения АТФазной активности. Полное удаление фосфатидилинозитола с сохранением других фосфолипидов благодаря обработке фосфолипазой С, специфичной к этому фосфолипиду, не влияло на $Na^+$, $K^+$-АТФазную активность. Обработка другой фосфолипазой С (Clostridium welchii) способствует удалению фосфатидилхолина с сохранением сфингомиелина и фосфатидилэтаноламина (30—40%). Однако несмотря на присутствие фосфатидилсерина и фосфатидилинозитола активность $Na^+$, $K^+$-АТФазы падает до 20% от контроля. После удаления фосфатидилинозитола и нейтральных липидов за счет комбинированного действия фосфатидилинозитолспецифической фосфолипазы С и фосфолипазы С из Clostridium welchii $Na^+$, $K^+$-АТФаза инактивируется до 82%.

В последующих вариантах препараты $Na^+$, $K^+$-АТФазы обрабатывали вначале фосфолипазой С, а затем фосфатидилсериндекарбоксилазой. В этом эксперименте фосфатидилсерин полностью превращался в фосфатидилэтаноламин без заметной инактивации $Na^+$, $K^+$-АТФазной активности. И, наконец, препараты транспортного фермента обрабатывали фосфатидилинозитолспецифичной фосфолипазой С, а затем фосфатидилсериндекарбоксилазой. За счет этого комбинированного эффекта происходит практически полное превращение фосфатидилсерина и фосфатидилинозитола, а $Na^+$, $K^+$-АТФаза содержит в основном нейтральные липиды, однако сохраняет около 44% активности.

Таким образом, доказано отсутствие необходимости в фосфатидилинозитоле, фосфатидилсерине в отдельности, но не при их совместном полном гидролизе. Показано, что $Na^+$, $K^+$-АТФаза может функционировать без кислых фосфолипидов.

### РОЛЬ ОТРИЦАТЕЛЬНО ЗАРЯЖЕННЫХ ФОСФОЛИПИДОВ В ПРОЯВЛЕНИИ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ $Na^+$, $K^+$-АТФазы

Все чаще появляются работы, посвященные исследованию влияния отрицательно заряженных фосфолипидов на делипидированную АТФазу (Palatini et al., 1977; Isern de Caldentey, Wheeler, 1977, 1979).

De Pont et al. (1978) проводили исследования на высокоочищенных препаратах из наружной медуллы почек кролика, полученных по методу Jorgensen (1974). Для определения специфичности фосфолипидов использовались различные комбинации фосфолипаз. Эти работы были подробно описаны выше (табл. 1 и 2). Сохранение АТФазной активности авторы объясняют наличием остаточного додецилсульфата натрия, который используется в количестве 7 моль/моль АТФазы. Многократные отмывки не могут исключить остаточных количеств детергента, находящихся в препарате и достаточных для создания отрицательного заряда, необходимых для проявления АТФазной активности.

Данные, полученные De Pont et al. (1978), противоречат многим данным по реактивации транспортного фермента фосфатидилсерином и другими кислыми фосфолипидами (Fenster, Copenhaver, 1967; Hokin, Hexum, 1972; Roelofsen, van Deenen, 1973; Palatini et al., 1977 и др.).

Duck-Chong (1976) предположил, что делипидизация приводит к образованию неактивных белковых агрегатов, связывание отрицательно заряженного фосфатидилсерина способствует появлению гидрофобных связей между белками и липидами.

Tanigushi, Yida (1971) определили, что ($H^3$)-оуабаин связывается с $Na^+$, $K^+$-АТФазой после 15-минутной преинкубации с фосфолипазой А и С. Однако не наблюдается реактивации фосфатидилсерином у препаратов, предварительно обработанных ($H^3$)-оуабаином. Это, по-видимому, свидетельствует о том, что фосфолипиды не нужны для связывания сердечного гликозида с $Na^+$, $K^+$-АТФазой, а придают ферменту отрицательный заряд.

С помощью комплексной обработки $Na^+$, $K^+$-АТФазы из микросом почек кролика фосфолипазами С (Bacillus cereus) и сфингомиелиназой С (Staphylococcus aureus) было удалено 95% общей массы липидов с сохранением в мембране лишь фосфатидилинозитола (Mandersloot et al., 1978). Несмотря на отсутствие других липидов фермент сохранял 50—100% первоначальной активности.

Принимая во внимание необходимость отрицательно заряженных фосфолипидов для проявления активности фермента, можно сделать вывод, что эта потребность полностью удовлетворяется фосфатидилинозитолом, составляющим только 5% от всех фосфолипидов мембраны. Обнаружена связь между остаточной активностью фермента и фосфатидилинозитолом, которая, по-видимому, свидетельствует в пользу того, что этот фосфолипид является эндогенным активатором $Na^+$, $K^+$-АТФазы.

Из этих работ следует, что состояние АТФазы после делипидизации путем экстракции незначительно отличается от фермента, делипидированного фосфолипазой $A_2$. По данным некоторых авторов (Palatini et al., 1977; Isern de Caltentey, Wheeler, 1979), отрицательно заряженные фосфолипиды максимально связываются с делипидированной $Na^+$, $K^+$-АТФазой. Это является важным

фактором в регуляции белок-липидного взаимодействия. Участие отрицательных зарядов непосредственно в белок-липидном взаимодействии в опытах с фосфатидилсериндекарбоксилазой (De Pont et al., 1978) можно объяснить двояко. Отсутствие инактивации АТФазной активности при 80%-ном превращении фосфатидилсерина в фосфатидилэтаноламин указывает на необходимость фосфатидилсерина для осуществления липид-белкового взаимодействия или непосредственно для проявления ферментативной активности. Оставшаяся незначительная часть фосфатидилсерина, возможно, связана с белком через полярные группы, и доступ к ним фосфатидилсериндекарбоксилазы затруднен.

В работах Mandersloot et al. (1978), De Pont et al. (1978) продемонстрирована необходимость фосфолипидов для $Na^+$, $K^+$-АТФазы из почек кролика (микросомальная фракция и высокоочищенный препарат фермента). Получены неоднозначные данные: согласно одним из них, $Na^+$, $K^+$-АТФаза проявляет специфичность к фосфатидилинозитолу, а в соответствии с другими — не отмечается абсолютной специфичности ни к фосфатидилинозитолу, ни к фосфатидилсерину.

При предположении, что следовые количества доцецилсульфата натрия были недостаточны для проявления $Na^+$, $K^+$-АТФазной активности после полного удаления фосфатидилсерина и фосфатидилинозитола (De Pont et al., 1978) и что сульфатиды при этом отсутствовали (Karlsson et al., 1974), правильнее звучит предположение, что отрицательный заряд не обязателен для проявления АТФазной реакции. Однако, согласно данным De Pont et al. (1978), наблюдается значительное изменение АТФазной активности (до 44%) при совместном удалении фосфатидилсерина и фосфатидилинозитола. В то же время Palatini et al. (1977) удалось показать улучшение связывания $Na^+$, $K^+$-АТФазы с искусственными липидными мембранами за счет фосфатидилсерина.

Следовательно, можно предположить, что эти отрицательно заряженные фосфолипиды расположены довольно близко от АТФазы в мембране и, возможно, in vivo включены во взаимодействие между белком АТФазы и липидным бислоем, способствуя встраиванию белка в соответствующую часть мембраны. Таким образом, эти данные при подобной интерпретации также могли бы подтвердить необходимость для реактивации $Na^+$, $K^+$-АТФазы отрицательно заряженных фосфолипидов.

Возможно, при этом происходит вначале образование белок-липидного комплекса в воде (Hilden, Hokin, 1976) за счет фосфатидилсерина или других кислых фосфолипидов, например фосфатидной кислоты (Palatini et al., 1977; Roelofsen, 1977). В этом случае данные, полученные нами по совместному синергичному эффекту фосфолипазы $A_2$ и ПГФ (Мирсалихова и др., 1974, 1975; Zaheer et al., 1979), могут быть объяснены не только улучшением доступности фермента к действию фосфолипазы $A_2$, но и нейтрализацией заряда фосфолипидных молекул, которые необходимы

для $Na^+$, $K^+$-АТФазы, так как цитотоксин связывается с кислыми фосфолипидами и некоторыми другими отрицательно заряженными компонентами мембран (Zaheer et al., 1979).

Решающую роль в проявлении активирующего эффекта на $Na^+$, $K^+$-АТФазу фосфолипазы *D*, по-видимому, играет увеличение отрицательного заряда на поверхности мембраны за счет фосфатидиловой кислоты, так как по данным De Pont et al. (1978), достаточно незначительных количеств додецилсульфата (7 моль/моль фермента) для проявления АТФазной активности.

Таким образом, вся совокупность приведенных выше данных показывает необходимость отрицательных зарядов для проявления активности делипидированной АТФазы, для соответствующего контакта между белком и липидом, но, к сожалению, не объясняет потребности в зарядах для протекания самой реакции. Сравнительный анализ действия фосфолипаз на наружные и внутренние поверхности мембран наряду с исследованиями ферментативной активности $Na^+$, $K^+$-АТФазы способствовал бы правильному решению вопроса относительно модели функционирования насоса, отношения фермента к липидам и т. д. Применение различных методов исследования $Na^+$, $K^+$-АТФазы и различных комбинаций высокоочищенных стандартных фосфолипаз с определенной субстратной специфичностью помогут существенно углубить сведения о роли липидов в проявлении активности этого фермента.

Следовательно, при правильном методическом подходе фосфолипазы могут быть использованы в качестве уникальных природных инструментов для изучения $Na^+$, $K^+$-АТФазы без глубокого разрушения тонкой структуры фермента, которая наблюдается при удалении фосфолипидов органическими растворителями. Благодаря химически чистым препаратам фосфолипазы $A_2$ и ПГФ подтверждена необходимость для работы $Na^+$, $K^+$-АТФазы определенной пространственной ориентации фермента в мембране, причем немаловажную роль играют липиды и поверхностный заряд.

ЛИТЕРАТУРА

Болдырев А. А. 1979. Роль липидов в функционировании $Na^+$, $K^+$-активируемой аденозинтрифосфатазы. «Биологические науки», № 3, 5—17.

Болдырев А. А., Твердислов В. А. 1978. Молекулярная организация и механизм функционирования $Na^+$-насоса. Итоги науки и техники. «Биофизика», **10.**

Кирсенко О. В., Вавилова Г. Л. 1971, Роль фосфолипидов в проявлении $Na^+$, $K^+$-АТФазной активности. «Укр. биох. журн.», **43,** № 1, 25—34.

Кирсенко О. В., Вавилова Г. Л. 1976. О роли липидов в структуре $Na^+$, $K^+$-АТФазы. «Молек. биол.», вып. 13, 44—57.

Мирсалихова Н. М. 1969. О действии фосфолипазы А на АТФазу мембран эритроцитов. Тез. докл. на II Всесоюзн. биохим. съезде. Ташкент, 51.

Мирсалихова Н. М., Зиямухамедов Р. А., Юкельсон Л. Я. 1974. Функциональное состояние $Na^+$, $K^+$-АТФазы при взаимодействии с прямым гемолитическим фактором яда кобры. Матер. симп. «Физико-химич. основы функционирования надмолекулярных структур клетки». М. 34—36.

Мирсалихова Н. М., Зиямухамедов Р. А., Юкельсон Л. Я. Эффект фосфолипазы А и «прямого» гемолитического фактора яда среднеазиат-

ской кобры на активность $Mg^{2+}$, $Na^{+}$-$K^{+}$-АТФазы клеток коры мозга. «Узб. биол журн.», № 3, 65—66.

Мирсалихова Н. М., Юкельсон Л. Я., Зиямухамедов Р. А. 1975. Участие ионов кальция и жирных кислот в торможении $Mg^{2+}$ и $Na^{+}$, $K^{+}$-АТФазы «прямым» гемолизином и фосфолипазой А яда кобры. «Укр. биохим. журн.», № 1, 61—64.

Мирсалихова Н. М., Рахимов М. М. 1977. Действие фосфолипаз А и D на $Mg^{2+}$ и $Na^{+}$, $K^{+}$-АТФазы микросом мозга. ДАН СССР, **233**, 5, 981—984.

Мирсалихова Н. М., Юкельсон Л. Я. 1973. Действие яда кобры и его фракций на аденозинтрифосфатазы мембран эритроцитов. «Узб. биол. журн.», № 2, 6—8.

Писарева Л. Н, Комкова А. И., Данилова Е. В. 1970. Взаимодействие гистонов с мембранной аденозинтрифосфатазой. «Цитология». **12**, 11, 1405—1411.

Писарева Л. Н., Парфенова Е. В. 1973. Влияние исходного состояния мембранного препарата $Na^{+}$, $K^{+}$-АТФазы на взаимодействие его с гистонами. — В кн. «Биофизика мембран». Каунас, 614—517.

Рахимов М. М. и др. 1978. Влияние ионов кальция на ферментативный гидролиз фосфолипидов в зависимости от физического состояния субстрата. «Биохимия», **43**, 3, 433—445.

Рожманова О. М. 1976. Исследование молекулярной структуры $Na^{+}$, $K^{+}$-АТФазы. «Молекул. биология», вып. 13, 74.

Сахибов Д. Н., Сорокин В. М., Юкельсон Л. Я. 1970. Выделение фосфолипазы А из яда среднеазиатской кобры. «Биохимия», **35**, 1, 13—16.

Ташмухамедов Б. А., Гагельганс А. И. 1973. Активный транспорт ионов через биологические мембраны. Ташкент.

Цваал Р., Роулофсен Б. 1979. Применение чистых фосфолипаз для изучения мембран. — В кн. «Биохимическое исследование мембран». М. 313—333.

Юкельсон Л. Я., Садыков Э., Сорокин В. М. 1974. Выделение и характеристика «прямого» гемолитического фактора яда среднеазиатской кобры. «Биохимия», **39**, 4, 816—821.

Ahmed K, Thomas B. S. 1971. The effects of long chain fatty acids on sodium plus potassium ion—stimulated adenosine triphosphatase of rat brain. J. Biol. Chem., **246**, 1, 103—109.

Chap H. J., Zwaal R. F. A., van Deenen L. L. M. 1977. Action of highly purified phospholipases on blood platelets. Evidence for an asymmetriç distribution of phospholipids in the surface membrane. Biochim. Biophys. Acta, **467**, 146—164.

Dahl J. L. Hokin L. E. The sodium-potassium adenosine tripnosphatase. Ann. Rev. Biochem., **43**, 327—356.

Deguchi N., Jorgensen P. L., Maunshbach A. 1977. Ultrastructure of sodium pump. J. Cell. Biol., **75**, 619—634.

De Pont J. J. H. H. M, Van Eeden P. A. Bonting S. L. 1973. Studies on ($Na^{+}$-$K^{+}$) activated ATPase XXXIV Phosphatidylserine not essential for ($Na^{+}$-$K^{+}$) ATPase activity. Biochim. Biophys. Acta, **323**, 3, 487—494.

De Pont J. J. H. M., Van Eeden P. A., Bonting S. L. 1978. Role of negatively, charged phospholipids in hignly purified ($Na^{+}$-$K^{+}$)-ATPase from rabbit kidney outer medulla. Studies on ($Na^{+}$+$K^{+}$)—activated ATPase, XXXIX. Biochim. Biophys, Acta. **M 508**, № 3, 464—477.

Duck-Chong C. O. 1976. A reassessment of the phospholipid dependence of membrane-bound enzymes with special reference to glucose-6-phosphatase and Na. K-dependent adenosine triphosphatase. Enzyme. *21,* 174—192.

Emmelot P. 1977. The organization of the plasma membrane of mammalian cells: structure in relation to function. In: Mammalian Cell Membrane. **2**, Butterworth.

Fenster J. L., Copenhaver J. H. 1967. Phosphatidyl serine requirement of ($Na^{+}$-$K^{+}$)—activated adenosine triphosphatase from rat kidney and brain. Biochim. Biophys. Acta, **137**, 406.

Goodman S. L., Wheeler K. P. 1978. Ouabain binding to phospholipid dependent adenosine triphosphatase. Biochem. J., **169**, 2, 313—320.

Hart W. M., Titus E. O. 1973. Sulfhydril groups of sodium-potassium transport adenosine triphosphatase. J. Biol. Chem., **248**, 13, 4674—4681.

Hilden S., Hokin L. 1976. Coupled Na, K-transport in vesicles containing a purified Na, K-ATPase and only phosphatidylcholine. Biochim, Biophys. Res. Commun, **69**, 521—527.

Hokin L. E., Hexum T. D. 1972. Studies on the characterization of the sodium, potassium transport adenosine triphosphatase, IX. On the role of phospholipids in the enzyme. Arch. Biochem. Biophys., **151**, 2, 453—464.

Isern De Caldentey M. I., Wheeler K. P. 1977. Interactions of phospholipids with sodium—plus—potassium ion—dependent adenosine triphosphatase. Biochem. Soc. Trans., **5**, 1, 107—108.

Isern De Caldentey M., Wheeler K. P. 1979. Requirement for negatively charged dispersions of phospholipids for interaction with lipid—depleted adenosine triphosphatase. Biochem. J., **177**, 265—273.

Jean D. H., Albers R. W. 1977. Molecular organization of subunits of electroplax (sodium plus potassium) — activated adenosine triphosphatase. J. Biol. Chem. **252**, № 7, 2450—2451.

Jorgensen P. L. 1974. Purification and characterization of (Na++K+)-ATPase III Purification from the outer medulla of mammalian kidney after selective removal of membrane components by sodium dodecylsulphate. Biochim. Biophys. Acta. **356**, 36—52.

Kabak H. R. et al (eds.). 1975. Molecular aspects of membrane phenomena. Berlin—Heidelberg, 1975.

Karlsson K. A., Samuelsson B. E., Steen G. O. 1974. The lipid composition and Na+, K+-dependent ATPase activity of the salt(nasal) gland of eider duck and Herring gull. Europ. Biochem., **46**, 243—258.

Kepner G. R., Macey R. J. 1968. Molecular weight estimation of membrane bound ATPase by in vacuo radiation inactivation. Biochem. Biophys, Res. Communs, **30**, 582.

Korenbrot J. I. 1977. Ion transport in membranes: incorporation of biological ion-translocating proteins in model membrane systems Ann. Rev. Physiol., **39**, 19—49.

Kotyk A., 1977. Membranes and transport. Acta Biochim. Biophys Acad. Sci. Hungg, **12**, 135—146.

Kyte J. 1971. Phosphorylation of a purified (Na++K+) adenosine triphosphatase. Biochem. Biophys. Res. Commun., **43**, 1259—1265.

Kyte J. 1974. The reactions of sodium and potassium ion—activated adenosinetriphosphatase with specific antibodies. Implications for the mechanism of active transport. J. Biol. Chem., **249**, 3652.

Mandersloot J. G., Roelofsen B., Cier De I. 1978. Phosphatidylinositol as the endogenous activator of the (Na+ +K+)-ATPase in microsomes of rabbit kidney. Biochim. Biophys. Acta, **M 508**, № 3, 478—485.

Miller H. M., Woodhouse S. P. 1977. Long chain fatty acid inhibition of sodium plus potassium—activated adenosine triphosphatase from rat heart. Austral. J. Exp. Biol. and. Med Sci., 1977, **55**, № 6, 741—752.

Naguchi T., Freed S. 1971. Dissociation lipid componentes and reconstitution at—75°C of $Mg^{2+}$ dependent, Na+ and K+ stimulated adenosine triphosphatase in rat brain. Nature New Biol., **230**, № 13, 148—150.

Nalsson O. S., Dallner G. 1977. Transverse asymmetry of phospholipid in subcellular membranes of rat liver. Biochim. Biophys. Acta, **464**, № 2, 453—458.

Palatini P. et al 1977. Activation of (Na++K+)-dependent ATPase by lipid vesicles of negative phospholipids. Biochim. Biophys. Acta, **466**, 1—9.

Robinson J. D., Flashner M. S. 1979. The (Na++K+) activated ATPase. Enzymatic and transport properties. Biochim. Biophys. Acta, **549**, 2, 145—176.

Roelofsen B. 1977. The role of acidic phospholipids in process of reconstruction of Na+, K+-ATPase, In: 11 th FEBS Meeting Copenhagen.

Roelofsen B., van Deenen L. L. M. 1973. Lipid requirement of membrane-bound ATPase. Studies on human erythrocyte ghosts. Eur. J. Biochem., 40, 1, 245—257.

Roelofsen B., Zwaal R. F. A., Van Deenen L. L. M. 1971. Lipoprotein integrity and enzymatic activity of erythrocyte membrane. In G. Porcellati a. F. De Jeso (eds.) Membrane Bound Enzymes, Plenum Press. New York, p. 209, 1971.

Schwartz A., Lindenmayer G. E., Allen J. C. 1975. The sodium—potassium adenosine triphosphatase: pharmacological, physiological and biochemical aspects. Pharmacol. Rev., 27, N 1, 1—134.

Skou J. C. 1957. The influence of some cations in the adenosinetri—phosphatase from peripheral nerves. Biochim. Biophys. Acta, 23, 394—401.

Skou J. C. 1965. Enzymatic basic for active transport of $Na^+$ and $K^+$ across cell membrane. Physiol. Rev., 45, 596—617.

Sood C. K., Sweet C., Zull Y. 1972. Interaction of kidney $Na^+$, $K^+$-ATPase with phospholipid model membrane system. Biochim. Biophys. Acta, 282, 429—434.

Stahl W. Z. 1973. Role of phospholipids in the $Na^+$, $K^+$-stimulated adenosine triphosphatase system of brain microsomes. Arch. Biochem. Biophys., 154, 56—57.

Sundler R., Alberts W., Vagelos P. R. 1978. Phospholipases as probes for membranes sidedness. Selective analysis of the outer monolayer of asymmetric bilayer vesicles. J. Biol. Chem., 253, 15, 5299—5304.

Tanaka R. 1974. Role lipids in activation of $Na^+$, $K^+$-dependent ATPase and $K^+$-dependent phosphatase of the brain. Rev. Neuroscience, 1, 181—230.

Taniguchi K., Yida S. 1972. The effect of phospholipids on the aparent activation energy of $Na^+$, $K^+$-ATPase. Biochim. Biophys. Acta, 274, 536—541.

Taugner G., Wähler A. 1974. Effects of lipid—modification on the isolated membrane of catecholamine storage vesicles. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharm., 282, 279.

Uesugi S. et al. 1971. Studies on the characterization of the sodium—potassium transport adenosine triphosphatase. VI. Large scale partial purification and properties of a lubrol—solubilized bovine brain enzyme J. Biol. Chem., 246, 531.

Walker J. A., Wheeler K. P. 1975. Polar head—group and acyl sidechain requirements for phospholipid—dependent $(Na^+ + K^+)$-ATPase. Biochim Biophys. Acta, 394, 135—144.

Weglicki W. B., Waite B. M., Stam A. C. 1972. Association of phospholipase A with myocardial membrane preparation containing the $(Na^+ + K^+)$-$Mg^{2+}$-ATPase. J. Mol. and Cell. Cardiol., 4, 195.

Zaheer A. Iyer Sh. S., Braganca B. M. 1979. Influence of charge on the inactivaton membrane bound $(Na^+ + K^+)$-ATPase of Yoshida sarcoma cells by inhibitor proteins from cobra venom. Cancer Biochem. Biophys., 3, 3, 123—127.

**Л. Я. ЮКЕЛЬСОН, Б. У. АТАКУЗИЕВ**

# ЯД СКОРПИОНА. ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ КОМПОНЕНТЫ И МЕХАНИЗМ ИХ ДЕЙСТВИЯ

Биологически активные вещества широко используются при изучении молекулярных основ различных физиологических функций. Наиболее эффективно применение веществ абсолютно индивидуальных, с хорошо изученными физико-химическими свойствами и механизмом действия. К их числу можно отнести токсические

компоненты из ядов животного происхождения (Mebs, 1973). Опыт успешного применения в научной практике некоторых из них уже освещался в литературе (Hahn von, Honegger, 1974; Narahashi, 1974; Albuquerque et al., 1979).

В настоящем обзоре рассмотрен состав и свойства яда скорпиона, основные способы получения из него чистых токсических компонентов, а также строение, физико-химические свойства и механизм действия этих компонентов. Приведенные данные могут быть полезны при исследовании механизмов реализации нервной функции и синаптической передачи, а также связанных с ними процессов ионного транспорта через возбудимые мембраны.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕЛЬНОГО ЯДА СКОРПИОНА

Нативный яд представляет собой бесцветную, слегка опалесцирующую тягучую жидкость. При растворении в дистиллированной воде или в присутствии солей он образует раствор вязкой консистенции, мутный из-за слизистых микросгустков. Растворимость яда во многом зависит от характера растворителя, его реакции и присутствия солей. Яд не растворяется в органических сольвентах: спиртах, эфирах, хлороформе, ацетоне, бензине. Крепкие кислоты, щелочи, хлороформ, марганцевокислый калий и йод разрушают яд (Пигулевский, 1975). В водных сольвентах растворимость яда снижается в следующей последовательности: 0,4 М ацетат аммония (pH 6,5), 0,1 М бикарбонат аммония, физиологический раствор, вода (Орлов и др., 1977). Удельный вес яда 1092, реакция обычно кислая (Пигулевский, 1975). Раствор яда скорпиона Buthus eupeus в дистиллированной воде имеет реакцию, близкую к нейтральной,— pH 6,45 (Атакузиев и др., 1974). В нативном яде содержится до 75—77% воды, 17—20% сухого остатка и 5—6% золы; обнаружены углерод, водород, азот, сера и хлор (Пигулевский, 1975).

Состав, свойства и биологическая активность яда скорпиона в значительной степени определяются способом его получения. В некоторых экспериментальных исследованиях в качестве токсического материала использованы экстракты или гомогенаты ядовитой железы или тельсона. Естественно, что такой материал содержит много балластных компонентов. Так, величина $ЛД_{50}$ яда и экстракта ядовитой железы скорпиона Buthus eupeus равна соответственно 3 и 4,5 мг на 1 кг веса тела белых мышей. Для добычи цельного яда скорпиона используют также методы механической и электрической стимуляции тельсона. Механическая стимуляция позволяет получить активный материал, но с небольшим выходом. При электрической стимуляции выход яда повышается, однако токсичность его падает, по-видимому, за счет увеличения содержания мукопротеинов, которые могут нейтрализовать токсические начала или просто являются балластом (Lissitzky et al., 1956). По этим же причинам менее токсичен, не стабилен и быст-

ро инактивируется при комнатной температуре материал, полученный при экстракции растертых тельсонов (Nitzan, 1970). Полагают (Орлов и др., 1977), что в этом случае токсины нейтрализуются еще и антителами против собственного яда, попадающими в экстракт из гемолимфы.

В наших исследованиях в качестве исходного материала использованы яды, полученные механической и электрической стимуляцией, а также экстракты ядовитой железы и тельсона. Выход яда зависел от многих условий (видовая принадлежность, размеры особи, сезонность взятия яда, частота доения и т. д.), но во всех случаях при электрической стимуляции был больше, чем при механической. Яды более активны по сравнению с экстрактами, однако мы не смогли подтвердить данные литературы (Lissitzky et al., 1956) о более высокой токсичности яда, полученного электростимуляцией. Можно предположить, что при механической стимуляции или получении яда естественным ужалением в гидрофобные пленки (Zlotkin, Shulov, 1969) выделяется токсичный секрет, по составу и свойствам наиболее близкий к нативному яду. Однако крайне низкий выход материала по массе препятствует широкому использованию этих способов. Метод электростимуляции применяется наиболее широко, так как позволяет получать большие количества яда, брать яд неоднократно и не оказывает существенного влияния на его свойства и состав.

По данным Пигулевского (1975), в зависимости от размеров особи от одного скорпиона удается получить до 3 мг сухого яда, но в среднем количество яда не превышает 0,5 мг; только в случае крупных тропических видов скорпионов количество яда достигает 30—40 мг в расчете на жидкий яд. По нашим данным, в среднем для получения 1 г яда скорпиона Buthus eupeus необходимо до 4000—5000 животных, а выделение 1 г яда скорпиона Ortochirus scrobiculosus требует еще большего числа особей. Эти результаты получены при использовании метода электрической стимуляции и подтверждены литературными данными (Miranda et al., 1970), которые показывают, что максимальный выход яда при электрическом доении каждую четвертую неделю достигает 1,5—2,0 мг сухого остатка от каждой особи.

Зависимость количества яда от частоты его взятия вполне объяснима, если предположить, что синтетическая деятельность ядовитой железы носит циклический характер и при наполнении железы продукцей регулируется химическими агентами. Это положение было экспериментально доказано для ядовитой железы змей (Bdolah, 1979). Возможно, по этим же причинам сезонность взятия яда и физиологическое состояние животных при этом определяют массу добываемого яда и его биологические свойства.

Токсичность цельных ядов или экстрактов ядовитой железы и тельсона в большой степени зависят от способов их дальнейшей обработки и хранения. Рекомендуют (Пигулевский, 1975) сушить яд в вакууме, затем помещать его в стеклянные ампулы, запаи-

ваемые после полного удаления воздуха, и хранить в темном и прохладном месте. В этих условиях материал сохраняет свои свойства в течение нескольких лет. При лиофильном высушивании происходит некоторая потеря токсичности (Miranda et al., 1964, 1970), причины которой будут обсуждены ниже при рассмотрении физико-химических свойств чистых токсинов. Следует заметить, что низкие температуры (до —30°C) не влияют на токсическую активность яда (Nitzan, 1970; Пигулевский, 1975), более того, лиофильно высушенный яд обычно хранят при —5°C над хлоридом кальция (Орлов и др., 1977). Достаточно удовлетворительно переносит яд и высокие температуры: он выдерживает кратковременное нагревание до 100°C (Пигулевский, 1975) и несколько снижает токсичность лишь при выдерживании в течение 5—6 ч при температуре 86° (Nitzan, 1970).

Доказаны видовые отличия в составе и токсических свойствах ядов скорпионов. По нашим данным, величина $ЛД_{50}$ лиофильно высушенных ядов Buthus eupeus и Ortochirus scrobiculosus составляет соответственно 3 и 1 мг/кг веса тела белых мышей. Таким образом, клиника и прогноз отравлений ядами скорпионов определяются не только количеством введенного яда, но и специфическими особенностями их состава. Здесь прежде всего играет роль содержание отдельных токсинов, которые в ядах различных видов скорпионов могут существенно различаться по строению и летальной активности. Естественно, что в экстрактах или гомогенатах ядовитой железы и тельсона содержание этих токсинов понижено из-за присутствия большой массы балластных компонентов; тем не менее, наши исследования показывают, что экстракты или гомогенаты вполне могут быть использованы в качестве резервного исходного материала в работах по выделению чистых токсинов.

Последовательно рассматривая химический состав яда скорпиона, можно отметить присутствие неорганических и органических веществ. Неорганическая часть яда представлена различными микроэлементами (Пигулевский, 1975; Орлов и др., 1977), однако ее детальные характеристики и соответствующие количественные измерения в литературе не представлены. Из органических веществ обнаружены моно- и полисахариды, липиды, биологически активные амины, свободные аминокислоты, но в основном белки и пептиды.

Наряду с простыми моносахаридами — гексозами — в яде выявлены их аминопроизводные: глюкозамин и галактозамин. Полисахариды — глюкозамингликаны или мукополисахариды — вообще характерны для вязких секретов различных ядовитых желез. Они могут находиться в связи с белками, образуя мукопротеины. Такие мукопротеиновые микросгустки, как и вязкие свойства секрета, из-за присутствия мукополисахаридов значительно затрудняют работу по фракционированию яда. В яде скорпиона преимущественно содержатся кислые мукополисахари-

ды и их производные: гиалуроновая кислота, хондроитинсульфаты А, В и С, гепаринсульфат (Bhaskaran, Kurup, 1973 а, б). Углеводы в большом количестве входят в состав белковых компонентов яда, и образованные таким образом гликопротеины хорошо обнаруживаются при электрофорезе яда в основном в его главной альбуминподобной фракции (Weissmann et al., 1958; Oommen, Kurup, 1964). Липопротеины на электрофореграммах яда не найдены или идентифицированы в следовых количествах.

Биогенные амины непременно присутствуют в большинстве ядов животного происхождения: змей, пчел, ос, пауков и т. д. В этом отношении яды скорпионов не составляют исключения. В ядах различных скорпионов выявлены гистамин и серотонин (5-гидрооксchallenge) , с действием которого связывают болевые ощущения при попадании яда в организм (Adam, Weiss, 1956, 1958; Welsh, Batty, 1963; Bhaskaran, Kurup, 1975; Ismail et al., 1975). Триптофан идентифицирован в ядах скорпионов в свободном виде (Bhaskaran, Kurup, 1975).

Таким образом, можно отметить, что в литературе недостаточно сведений, характеризующих небелковые органические вещества, составляющие яд скорпиона. На протяжении последних лет более детальным исследованиям были подвергнуты белково-пептидные компоненты яда.

Спектрофотометрические измерения и метод определения белка по Лоури позволили нам установить, что до 80% всей массы яда скорпиона Buthus eupeus составляют белки и пептиды. По данным литературы (Diniz, Goncalves, 1956, 1960; Weissmann et al., 1958; Russell et al., 1968), в ядах различных видов скорпионов содержится 50—60% белка. Поглощающая способность растворов ядов различных скорпионов при спектрофотометрировании при 280 и 260 нм не имеет существенных отличий (Russell et al., 1968; Атакузиев и др., 1974).

В связи с идентификацией фармакологически активных и летально действующих компонентов ядов скорпионов проделана значительная работа по изучению их диализуемости. Результаты этих исследований имеют ограниченное значение из-за отсутствия достоверной информации относительно размеров пор в диализационных мембранах и, следовательно, молекулярных размеров веществ, проходящих через эти мембраны, однако они представляют определенный интерес, так как характеризуют химический состав яда, а также природу и некоторые свойства содержащихся в нем физиологически активных веществ. О сравнительно низкомолекулярном составе яда скорпиона можно судить на том основании, что цельный яд свободно проходит через фильтры Шамберлена и Беркенфельда (Пигулевский, 1975).

Проведение диализа яда связано с определенными трудностями. Прежде всего, установлено, что степень диализуемости ядов зависит от характера растворителя и состава яда (Bolivar, Rodriguez, 1953 a, b; Орлов и др., 1977). Против воды и раствора Рин-

гера диализ яда скорпиона протекал малоэффективно, в ходе диализа яд не терял активности (Diniz, Goncalves, 1956; Adam, Weiss, 1959). Считают, что при таком диализе через мембрану диффундирует до 12—20% всей массы цельного яда, причем белки и пептиды не обнаружены, а диффузат не обладал токсическими свойствами (Babin et al., 1971; Zlotkin et al., 1974). С другой стороны, при изменении условий диализа и, прежде всего, характеристик, используемых для диализа мембран, наблюдается выход веществ с положительной реакцией Фолина, обладающих активностью цельного яда (Nitzan et al., 1963; Kapadia et al., 1964; Osman et al., 1972; El Asmar et al., 1972; Watt, 1974). Вещества диализующейся фракции (диализата) оказались термостабильными, полностью растворялись в разбавленных кислотах, щелочах и воде, но не растворялись в органических сольвентах, что свидетельствовало об отсутствии в диализате липидов и гетероциклических соединений (Nitzan et al., 1963). Диализат, подобно цельному яду, стимулировал мышечную деятельность препарата матки крысы, при введении животным вызывал болевые ощущения и действовал летально, причем эффективнее, чем недиализующаяся часть яда (Nitzan et al., 1963; El Asmar et al., 1972). Болевые ощущения могли объясняться действием серотонина (Welsh, Batty, 1963), однако летальные свойства диализата должны быть обусловлены присутствием других компонентов, так как показано (Adam, Weiss, 1956, 1958), что полное удаление серотонина при экстракции ацетоном не изменяет токсичности материала. Ясно, что диализующаяся фракция яда представлена низкомолекулярными компонентами. Размеры пор в диализационных мембранах и свойства растворителей определяют, насколько компоненты яда с летальной активностью будут проходить через мембраны; во всяком случае, изучение диализатов показывает белковую или пептидную природу этих компонентов.

В многочисленных электрофоретических исследованиях охарактеризован белковый состав ядов скорпионов, что позволяет провести предварительную идентификацию токсических компонентов яда (Goncalves, 1960; Master et al., 1963; Oommen, Kurup, 1964; Russell, 1967, 1968; Babu et al., 1971; El Asmar et al., 1972). Результаты во многом зависят от условий электрофореза и, вместе с тем, свидетельствуют о межвидовых различиях в составах белков ядов различных скорпионов. Ниже приведены данные зарубежных исследователей в сравнении с нашими результатами. Электрофорез проводили на ватмане 3 ММ, вероналовый буфер pH 8,6, ионная сила 0,05, сила тока 10 мА, время 14—18 ч)

| *Образец* | *Количество компонентов* | | |
|---|---|---|---|
| | *анодных* | *катодных* | *всего* |
| Leiurus quinquestriatus H et E | 3 | 3 | 6 |
| Buthus occitanus ssp. | 3 | 3 | 6 |
| Prionurus bicolor H et E | 3 | 3 | 6 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Prionurus crassicauda 01 | 2 | 3 | 5 |
| Orthochirus innesi E. Sim. ssp. | 3 | 5 | 8 |
| Nebo hierichonticus E. Sim. | 3 | 1 | 4 |
| Buthofus judaicus | 3 | 3 | 6 |
| Buthus eupeus* | | 9 | 9 |
| Orthochirus scrobiculosus* | | 12 | 12 |

*Электрофорез ядов среднеазиатских скорпионов вели в 15% полиакриламидном геле, β-аланиновый буфер pH 4,3, ионная сила 0,4, сила тока 7 мА на трубочку, время 130—140 мин.

При электрофорезе в щелочных буферных средах общее число анодных фракций равно количеству катодных, в кислых буферных средах катодных фракций больше. Вне зависимости от pH среды катодные компоненты по массе превалируют над анодными (Nitzan, Shulov, 1966; Rosin, 1969). При электрофорезе на полиакриламидном геле в кислой буферной среде мы не смогли обнаружить в ядах скорпионов Buthus eupeus и Ortochirus scrobiculosus анодных фракций, тогда как число катодных достигало 9 и 12 соответственно. Интересно, что именно среди этих главных по массе и мигрирующих к катоду фракций найдены токсические компоненты яда (McIntosh, Watt, 1967).

Разрешающая способность электрофоретического метода зависит от носителя и других условий опыта. Поэтому приведенные выше данные не отражают сложного состава белков в ядах скорпионов. Значительно большее число отдельных белковых компонентов выявляется с помощью иммуноэлектрофореза (McIntosh, Watt, 1967). В наших исследованиях электрофокусирование на ПААГ с амфолином в интервале pH 3,0—9,0 позволило обнаружить в составе яда скорпиона Buthus eupeus до 22 белковых компонентов, что также является минимальным.

Некоторые из содержащихся в ядах скорпионов белков представлены ферментами (Орлов и др., 1977). Среди них в связи с гемолитическим действием яда наибольший интерес представляет фосфолипаза $A_2$.

| *Тривиальное название* | *Шифр* | *Систематическое название* |
|---|---|---|
| | Гидролазы | |
| Фосфолипаза $A_2$ | 3.1.1.4 | Фосфатидацилгидролаза |
| Фосфолипаза В (лизофосфолипаза) | 3.1.1.5 | Лизолецитин-ацилгидролаза |
| Ацетилхолинэстераза | 3.1.1.7 | Ацетилхолин-ацетилгидролаза |
| Кислая фосфатаза | 3.1.3.2 | Фосфогидролаза моноэфиров ортофосфорной кислоты |
| 5-нуклеотидаза | 3.1.3.5 | 5-рибонуклеотидфосфогидролаза |
| Фосфодиэстераза | 3.1.4.1 | Фосфогидролаза ортофосфорных диэфиров |
| Гиалуронидаза | 3.2.1. | Гиалуронат-гликаногидролаза |
| | Трансферазы | |
| Рибонуклеаза | 2.7.7.16 | Полирибонуклеотид-2-олигонуклеотидтрансфераза (циклизирующая) |

Сведения о содержании фосфолипазы $A_2$ в ядах различных скорпионов отличаются крайней противоречивостью. Наряду с результатами, свидетельствующими о полном отсутствии фермента в ядах скорпионов (Master et al., 1963; Ibrahim 1967), в литературе имеются данные о высокой активности фермента в яде (Balozet, 1956; Mohamed et al., 1969; Bhaskaran, Kurup, 1973). Аналогичные противоречия были отмечены при регистрации гемолитической активности ядов различных видов скорпионов. В связи с этим необходимо указать, что в ряде работ тестом для обнаружения фосфолипазы $A_2$ служит измерение гемолитической активности яда в присутствии экзогенных фосфолипидов. Причины расхождения данных о содержании фосфолипазы $A_2$ в ядах различных скорпионов пока не ясны. Не исключено, что это отражает межвидовые отличия в составах ядов скорпионов. Кроме того, следует учитывать многочисленные методические трудности при определении активности фосфолипазы $A_2$ в ядах. Так, основу гемолитического теста составляет образование под влиянием фосфолипазы $A_2$ гемолитически активных лизосоединений, однако они могут разрушаться до гемолитически неактивного глицерофосфорилхолина содержащейся в ядах скорпионов фосфолипазой B (лизофосфолипазой), активность которой в цельном яде высока (Mohamed et al., 1969).

Могут представить интерес наши данные, свидетельствующие, что яды скорпионов B. eupeus, B. caucasicus и O. scrobiculosus вызывают нарушение энергетических процессов и набухание изолированных митохондрий, сопровождающееся увеличением проницаемости их мембран для ионов и уменьшение стабильности искусственных бислойных фосфолипидных мембран. Гемолитическая активность ядов индуцируется в присутствии цитотоксина («прямого» гемолизина) из яда кобры. Описанные эффекты являются непременным атрибутом смесей, содержащих фосфолипазу $A_2$, которую мы не сумели обнаружить прямыми измерениями в перечисленных выше ядах скорпионов.

Исследования других ферментов из приведенных выше практически ограничивались их идентификацией в ядах различных скорпионов. Считают (Sarabini-Costellani, 1938; Diniz, Goncalves, 1960 б; Bhaskaran, Kurup, 1975), что гиалуронидаза играет существенную роль в распространении полипептидных токсинов яда в организме. Холинэстераза ядов скорпионов гидролизует ацетилхолин активнее, чем бутирилхолин, на основании чего ее относят к «истинным» ацетилхолинэстеразам (Bhaskaran, Kurup, 1973). Если полагать, что впрыскиваемый в тело жертвы яд одновременно участвует в ее переваривании, то становится вполне понятным присутствие в яде названных гидролаз, а также различных фосфатаз (Bhaskaran, Kurup, 1975). Вместе с тем, обращает внимание факт отсутствия в ядах скорпионов протеолитических ферментов; не ясны причины и биологический смысл содержания в яде ри-

бонуклеазы с трансферазными свойствами (Bhaskaran, Kurup, 1975).

Главный токсический эффект ядов скорпионов, заключающийся в поражении нервной системы, по-видимому, не связан с присутствующими в яде ферментами и другими высокомолекулярными белками. Это хорошо демонстрируют первые опыты по выделению из ядов скорпионов токсического начала, в которых очистка токсина достигалась за счет осаждения большей части балластных белков этиловым спиртом (Орлов и др., 1977). Анализ биологического действия белковых фракций, получаемых при диализе яда, также свидетельствует о низкомолекулярной природе содержащегося в яде токсина (или токсинов). Основываясь на этом, можно заключить, что токсические компоненты яда являются полипептидами. Ниже будут описаны основные способы выделения этих токсических полипептидов и представлены данные о их строении и физико-химических свойствах.

## ВЫДЕЛЕНИЕ ТОКСИЧЕСКИХ ПОЛИПЕПТИДОВ ЯДОВ СКОРПИОНОВ И ИХ ПЕРВИЧНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Развитие современных методов препаративной биохимии (хроматография, электрофорез, гельфильтрация, изоэлектрическое фокусирование и др.) позволило успешно решать задачи, связанные с выделением чистых токсинов из разных ядов. Однако в случае ядов скорпионов существуют значительные трудности, обусловленные плохой растворимостью исходного материала — яда независимо от способа его получения. Плохая растворимость и «тягучая» консистенция водных растворов яда скорпиона объясняются присутствием мукопротеинов (Miranda et al., 1970), которые должны быть предварительно удалены.

Существует несколько способов удаления мукопротеинов: диализ, обработка яда ацетоном и, наконец, водная экстракция с последующим центрифугированием. Последний способ успешно использован нами при подготовке к хроматографии ядов скорпионов B. eupeus и O. scrobiculosus, однако, так как проэкстрагированный водой и отцентрифугированный яд все же сохранял достаточно густую консистенцию, мы дополнили указанную выше процедуру водной экстракции гельфильтрацией на сефадексе G-50.

Анализ состава, свойств и биологического действия отдельных частей яда скорпиона позволяет четко сформулировать химические задачи, связанные с выделением из яда чистых токсинов. В обобщенном виде они сводились к фракционированию низкомолекулярных положительно заряженных белков (или полипептидов), что предполагало предварительное получение суммарной фракции таких полипептидов. Решение этих задач можно проиллюстрировать на примере выделения чистых токсинов из ядов среднеазиатских скорпионов B. eupeus и O. scrobiculosus.

Яд B. eupeus, предварительно подвергнутый экстракции водой и центрифугированию, хроматографировали на последовательно соединенных колонках с сефадексом G-50 и биогелем P-10. При этом достигалось не только полное удаление мукопротеинов, но и отделение некоторых высоко- и низкомолекулярных компонентов яда. В результате удалось получить суммарную фракцию A, содержащую вещества с молекулярными весами в пределах 5000—15000 и действующую токсически на тараканов (насекомые), мокриц (ракообразные) и мышей (млекопитающие). Эта суммарная фракция A послужила исходным материалом для последующего получения чистых селективно действующих токсинов. С помощью гельфильтрации с рециклизацией на биогеле P-10 исходный материал разделен на 7 фракций, каждую из которых в дальнейшем подвергали ионообменной хроматографии на КМ-целлюлозе. Уже на этом этапе были получены в чистом виде 5 токсинов для млекопитающих и 1 для насекомых. Заключительная хроматография части фракций на ДЭАЭ-сефадексе A-50, проведенная с рециклизацией и в равновесных условиях, позволила получить в гомогенном состоянии еще 3 токсина для млекопитающих и 3 инсектотоксина. Таким образом, из цельного яда B. eupeus всего получено 8 токсинов для млекопитающих и 4 для насекомых (табл. 1).

По электрофоретическому составу и токсичности для теплокровных и насекомых яд скорпиона O. scrobiculosus несколько отличается от яда B. eupeus. Тем не менее, при его фракционировании мы действовали аналогично, дополняя в ряде случаев общую процедуру очистки токсинов (табл. 1) хроматографией отдельных фракций на ионообменной смоле Biorex-70 или КМ-сефадексе C-25. К настоящему времени из этого яда мы получили в чистом виде 1 токсин для млекопитающих и 1 инсектотоксин и обнаружили большое число фракций, летальных для теплокровных, насекомых и ракообразных.

Использование комбинации гельфильтрации и хроматографии на катионообменниках является традиционным при выделении токсинов из ядов скорпионов (Miranda et al., 1960) и вполне оправдано свойствами исходного материала. Это хорошо доказывают итоги многолетних исследований группы французских ученых (Miranda, Lissitzky, 1958; Miranda et al., 1960, 1962, 1970, 1972; Rochat et al., 1966, 1967; Zlotkin et al., 1971, 1972, 1975), выделивших аналогчным способом большое число различных селективно действующих токсинов из ядов скорпионов A. australis, B. occitanus и L. quinquestriatus. Для выделения токсинов из яда скорпиона T. serrulatus разные группы исследователей использовали независимо друг от друга 2 способа, один из которых заключался в гельфильтрации яда на сефадексе и последующей хроматографии активных фракций на КМ-целлюлозе (Gomez, Diniz, 1966; Freire-Maia et al., 1970), другой — в гельфильтрации яда

на биогеле и хроматографии на катионнообменной смоле Biorex-70 (Linden, Raftery, 1976), в обоих случаях получены 2 токсина.

Применение хроматографии без предварительной гельфильтрации яда оказлось менее эффективным. Так, только по одному токсину было выделено при непосредственной хроматографии ядов скорпионов на катионообменной смоле амберлит CG-50 (Catterall,

Таблица 1

**Выделение токсинов из яда среднеазиатского скорпиона Buthus eupeus**

| Стадия разделения | Активные фракции | Выход из сырого яда, вес % | $ЛД_{50}$ (мкг/кг) мыши | $Д_{100}$ (мкг/таракана) | Выход по токсичности, % |
|---|---|---|---|---|---|
| Центрифугирование | Цельный яд ........ С | 91,67 | 3000 | 25 | |
| Гельфильтрация на биогеле Р-10 | С ........ А | 38,58 | | | |
| Гельфильтрация с рециклизацией на биогеле Р-10 | А → I | 3,50 | 250 | | |
| | А → II | 5,62 | 2000 | | |
| | А → III | 8,24 | 300 | | |
| | А → IV | 0,71 | 600 | | |
| | А → V | 2,85 | 750 | | |
| | А → VI | 5,00 | — | | |
| | VII | 6,32 | 1700 | | |
| Хроматография на КМ-целлюлозе СМ-32 | I ........ $М_7$ | 0,77 | 250 | | 9,24 |
| | II ........ $М_4$ | 0,10 | 750 | | 0,40 |
| | III ........ $КМ_1$ | 0,47 | 1000 | | |
| | III ........ $КМ_2$ | 0,41 | 500 | | |
| | IV ........ $М_8$ | 0,51 | 300 | | 5,10 |
| | V ........ $М_5$ | 0,54 | 100 | | 1,62 |
| | V ........ $КМ_6$ | 0,36 | 150 | | |
| | V ........ $И_2$ | 0,58 | | 1 | 14,50 |
| | VI ........ $КИ_1$ | 2,80 | | | |
| | VII ........ $М_3$ | 1,23 | 1000 | | 3,62 |
| | VII ........ $И_4$ | 0,35 | | | 1,75 |
| Хроматография с рециклизацией на ДЭАЭ-сефадексе А-50 | $КМ_1$ ........ $М_1$ | 0,11 | 150 | | 2,20 |
| | $КМ_2$ ........ $М_2$ | 0,14 | 600 | | 0,70 |
| | $КМ_6$ ........ $М_6$ | 0,20 | 200 | | 3,00 |
| | $КИ_1$ ........ $И_1$ | 2,06 | | 3 | 17,10 |
| | $КИ_1$ ........ $И_3$ | 0,57 | | 3 | 4,75 |

Примечание. М—токсины для млекопитающих, И—токсины для насекомых.

1976) или анионообменнике ДЭАЭ-целлюлозе (Watt, 1964; McIntosh, Watt, 1973). Возможно, токсичность отчасти теряется вследствие прочной адсорбции токсинов на ионообменнике или в результате денатурации молекул токсинов в процессе ионообменной хроматографии (Zlotkin et al., 1975). При хроматографии цельного яда на КМ-целлюлозе отмечено распределение токсичности по большому числу фракций, из которых при последующей хрома-

тографии на амберлите CG-50 или ДЭАЭ-сефадексе А-50 получены в чистом виде 8 токсинов, названных «токсичными вариантами», или изотоксинами (McIntosh, Watt, 1972; Watt et al., 1974; Babin et al., 1974, 1975). Причины такого «размывания» токсичности по ходу хроматограммы не вполне ясны. Они могут быть связаны с присутствием в одном яде множественных форм токсинов, действующих на животных одного класса, так называемых изотоксинов, или токсичных вариантов, которые отличаются друг от друга химически заменами аминокислотных остатков в отдельных позициях полипептидной цепи. Возможны ассоциация молекул токсинов друг с другом или их комплексирование с другими компонентами яда, например гликопротеинами (Miranda et al., 1966; Rochat et al., 1966, 1967). Не исключено, что существование подобных аберрантных форм токсинов имеет физиологическое значение, так как известно, что с увеличением степени чистоты токсинов летальное действие их разбавленных растворов ослабляется, но может быть сохранено при добавлении посторонних белков, например альбумина или сыворотки крови человека (Rochat et al., 1967; Miranda et al., 1970; Karlsson, 1973). Полагают (Rochat et al., 1967; Miranda et al., 1966, 1972), что хроматография на анионообменнике ДЭАЭ-сефадексе А-50 способствует диссоциации агрегатов или ионных комплексов токсинов с другими белками яда, и потому при очистке токсинов она вводится в качестве обязательного этапа, предшествующего хроматографии на катионообменниках (Rochat et al., 1967; Miranda et al., 1970, 1972; Zlotkin et al., 1971), или на заключительной стадии, как и при выделении токсинов из яда среднеазиатских скорпионов B. eupeus и O. scrobiculosus (табл. 1).

В ядах некоторых скорпионов (L. quinquestriatus) часть токсинов находится в прочной связи с кислыми компонентами, возможно, мукопротеинами. «Кислые фракции» таких токсинов необратимо адсорбируются на анионообменниках (ДЭАЭ-сефадексе А-50), а также на катионообменниках при pH ниже 6,7. При более высоких значениях pH эти фракции вообще не вступают в обмен с карбоксилсодержащими ионообменниками (Орлов и др., 1977). Поэтому при разделении этих токсинов использовали минимальные различия в размерах их молекул и способность адсорбироваться на сефадексе, однако отделения токсинов друг от друга удалось добиться только за 15 циклов гельфильтрации, причем выделенные токсины не были гомогенными и получены с крайне низким выходом (Miranda et al., 1970).

В заключение следует остановиться на вопросе о гомогенности полученных препаратов токсинов. Ее установление затруднено из-за присутствия в одном яде множественных форм токсинов, а также способности токсинов агрегировать или образовывать комплексы с другими компонентами яда. Одинаковая скорость миграции изотоксинов в электрическом поле приводит к ошибкам при использовании метода электрофореза (Miranda et al., 1970; Zlot-

kin et al., 1972; Babin et al., 1974). Электрофоретически гомогенные препараты некоторых токсинов на самом деле оказались комплексами токсинов и гликопротеинов (Rochat et al., 1967). Близость молекулярных весов токсинов снижает разрешающую способность аналитического ультрацентрифугирования (Rochat et al., 1967) и гельфильтрации, а сходство N- и С-концевых участков полипептидных цепей обусловливает неприменимость анализа концевых аминокислотных остатков в качестве критерия гомогенности токсинов. Из-за высоких значений pI токсинов непригоден и метод изоэлектрического фокусирования. Более успешно применяются методы иммунодиффузии и имуноэлектрофореза с использованием антисывороток к цельному яду скорпиона, а также к отдельным токсинам (McIntosh, Watt, 1970, 1973).

## СТРОЕНИЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ТОКСИНОВ ЯДА СКОРПИОНА

Фракционирование ядов скорпионов и оценка летального действия полученных фракций на животных различных систематических групп позволили установить присутствие в яде веществ с избирательной токсичностью для млекопитающих, насекомых и ракообразных. Полагают, что присутствие в яде селективных токсинов отражает адаптацию скорпионов к изменяющимся условиям питания и окружающей среды в процессе эволюции (как известно, скорпионы — одни из наиболее древних животных).

Наличие полипептидных токсинов с селективной активностью в отношении разных животных представляет существенный интерес в связи с возможностью использования этих токсинов при решении ряда фундаментальных вопросов сравнительной и эволюционной физиологии и биохимии.

**Токсины для млекопитающих (mammal toxins).** Эти токсины являются простыми полипептидами из 57—78 аминокислотных остатков с молекулярными весами в пределах 6000—8000 дальтон. Приведенные в литературе (Miranda, Lissitzky, 1961; Miranda et al., 1961, 1964) более высокие значения молекулярных весов токсинов (от 11000 до 18000 дальтон) объясняются способностью токсинов агрегировать с образованием ди- и тримеров или комплексированием с гликопротеинами (Rochat et al., 1966, 1967). Токсины для млекопитающих — сильноосно́вные полипептиды, которые в зависимости от pH среды могут присутствовать в различных молекулярных формах. Одна из таких форм, преобладающая при pH 4,0—9,0, термостабильна и устойчива к денатурирующим воздействиям (Chicheportiche, Lazdunski, 1970).

В табл. 2 показан аминокислотный состав токсинов, полученных из яда скорпиона B. eupeus. Представленные в табл. 2 данные могут также характеризовать аминокислотный состав токсинов для теплокровных из ядов других скорпионов. Обращает внимание полное отсутствие в этих токсинах метионина и одинаковое

содержание остатков полуцистина. Так как существование свободных сульфгидрильных групп в токсинах не установлено, можно полагать, что все обнаруженные в их составе 8 остатков полуцистинов замкнуты четырьмя дисульфидными связями. В токсинах отмечено высокое содержание положительно заряженных аминокислотных остатков — 9—18% от общего числа. Обнаружение большого числа остатков дикарбоновых аминокислот с учетом сильной основности молекул токсинов позволяет заключить, что часть аспарагиновой и глутаминовой аминокислот находится в

Таблица 2

**Аминокислотный состав токсинов для млекопитающих из яда скорпиона Buthus eupeus**

| Аминокислота | $M_1$ | $M_2$ | $M_3$ | $M_4$ | $M_5$ | $M_6$ | $M_7$ | $M_8$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Asp | 11 | 10 | 9 | 10 | 11 | 9 | 13 | 10 |
| Thr | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 |
| Ser | 4 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 4 | 3 |
| Glu | 6 | 4 | 5 | 6 | 4 | 2 | 4 | 3 |
| Pro | 6 | 3 | 4 | 5 | 6 | 3 | 4 | 5 |
| Gly | 6 | 5 | 6 | 6 | 8 | 6 | 9 | 7 |
| Ala | 7 | 4 | 5 | 5 | 6 | 4 | 6 | 6 |
| 1/2 Cys | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 |
| Val | 2 | | 3 | 2 | 2 | 3 | 1 | 1 |
| Met | | | | | | | | |
| Ile | 4 | 2 | 2 | 3 | 4 | 4 | 2 | 2 |
| Leu | 3 | 2 | 1 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 |
| Tyr | 4 | 3 | 6 | 4 | 5 | 4 | 4 | 4 |
| Phe | | | 1 | 1 | | 2 | 2 | |
| His | 2 | 3 | | 4 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Lys | 5 | 5 | 8 | 5 | 9 | 5 | 3 | 5 |
| Arg | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Trp | 3 | 3 | 4 | 2 | 4 | 2 | 5 | 3 |
| Всего | 75 | 60 | 68 | 70 | 78 | 64 | 73 | 64 |
| N-концевая | Ala | Ala | Val | Ala | Ala | Ala | Ala | Ala |

амидной форме. Следует отметить отсутствие или незначительные количества фенилаланина при высоком содержании другой ароматической аминокислоты — тирозина.

Небольшие по размеру молекулы токсинов характеризуются относительно высоким содержанием глицина, аланина, пролина, что в совокупности с установленными в них четырьмя дисульфидными мостиками может объяснить их высокую стабильность. Действительно, установлено, что токсины для млекопитающих полностью сохраняют активность в течение 5 ч при обработке их 8 М мочевиной при 20°C, и только после инкубации в течение 18 ч при 50°C инактивируются на 82% (Rochat et al., 1967).

На N-концах полипептидных цепей токсинов яда B. eupeus идентифицирован аланин, и только в одном токсине $M_3$ на N-конце установлен валин. В токсинах из ядов других скорпионов в ка-

12—156

| | | Структурные группы токсинов |
|---|---|---|
| A I | KRDGYIVYPN—NCVYHCVPP——————GDGLCKKN—GGSSGSSCFLV—PCGLACWC—KDLPDNVPIKDTSRKCT | |
| A I′ | KRDGYIVYPN—NCVYHCIPP——————CDGLCKKN—GGSSGSSCFLV—PCGLACWC—KDLPDNVPIKDTSRKCT | I |
| A III | VRDGYIVNSK—NCVYHCVPP——————CDGLCKKN—GASSGSSC . . . . . . | |
| A II | VKDGYIVDDV—NCTYFCGR———NAYCNEECTKL—KGESG—YCQWASPYGNACYCYK—LPDHVRTKGPGR—CH | |
| B III′ | LKDGYIVDDR—NCTYFCGT———NAYCNEECVKL—KGE . . . . . . . . . | |
| B III | VKDGYIVDDR—NCTYFCGR———NAYCNEEC . . . . . . . . . . . . . . | II |
| L V | LKDGYIVDDK—NCTFFCGR———NAYCNNEC . . . . . . . . . . . . . . | |
| AmII | LKDGYIIEDI—NCVFFCGR———NAYCDXXC . . . . . . . . . . . . . . | |
| B I′ | VRDAYIAQNY—NCVYTCFK———NEYCNDLCXXN—G . . . . . . . . . . . . . . . . | |
| B I″ | GRDAYIAQPE—NCVYECAK . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . | |
| B II | GRDAYIAQPE—NCVYECAK———NVYCND . . . . . . . . . . . . . . . . . . | |
| L III | VRDAYIAKNY—NCVYECFR———DSYCNDLC . . . . . . . . . . . . . . . . . | III |
| Bp I | GRCVYIADIA—NCAY . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . | |
| Bp II | GRDAYIADDX—NCAYXCAL———XXYCN . . . . . . . . . . . . . . . . . . . | |
| Cs I | —KEGYLVSKSTGCKYECLKLGDNDYCL . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . | |
| Cs III | —KEGYLVSKSTGCKYECLKLGDNDYCLRECKQQYGKSSGGYCYAF——————ACWC—EALPDHTQVW—VPNKCT | |
| Cs VI | —KEGYLVKKSDGCKYDCFWLGKNEHNTCECKAKNQGGSYGYCYAF——————ACWC——EGLPESTPTYPLPNKCSS | IV |
| Cs VII | —KEGYLVNKSTGCKYGCLKLGENEGNKCECKAKNQGGSYGYCYAF——————ACWC—EGLPESTPTYPLPNKCSS | |
| Cs VIII | —KEGYLVKKSDGCKYGCLKLGENEGNTCECKAKNQGGSYGYCYAF——————ACWC—EGLPESTPIYPLPNKCSS | |
| C I | —KDGYLVEK—TGCKKTCYKLGENDFCNRECKWKHIGGSYGYCYGF——————GCYC—EGLPDSTQTWPLPNKCT | |

Схема I. Аминокислотные последовательности токсинов для млекопитающих из ядов различных скорпионов (Rochat, Sampieri, 1976). Аминокислотные остатки обозначены однобуквенным кодом IUPAC.

Токсины ядов скорпионов: A—A. australis; B—B. o. tuneatanus; L—L. quinquestriatus; Bp—B. o. paris; C—C. sculpturatus; Cs—C. s. suffusus.

честве N-концевых аминокислотных остатков идентифицированы лизин, валин, лейцин и глутаминовая кислота.

Несмотря на отличия в N-концевых аминокислотных остатках и выраженную структурную гетерогенность «скорпионовых» токсинов, в целом отмечается высокая степень гомологии N-концевых последовательностей этих токсинов (Rochat et al., 1970 а, б; Zlotkin, 1973). Так, Орлов и др. (1977) обращают внимание на постоянное положение в токсинах следующих аминокислотных остатков: Asp (3), Gly (4), Tyr (5), Asx (11) и Tyr (14), сосредоточенных в N-концевой части молекул токсинов (схема 1). В большинстве токсинов полностью инвариантны позиции двух первых и трех последних остатков полуцистинов. Предполагается (Kupeyan et al., 1974; Rochat et al., 1976), что в токсинах для млекопитающих топография дисульфидных связей одинакова (схема 2).

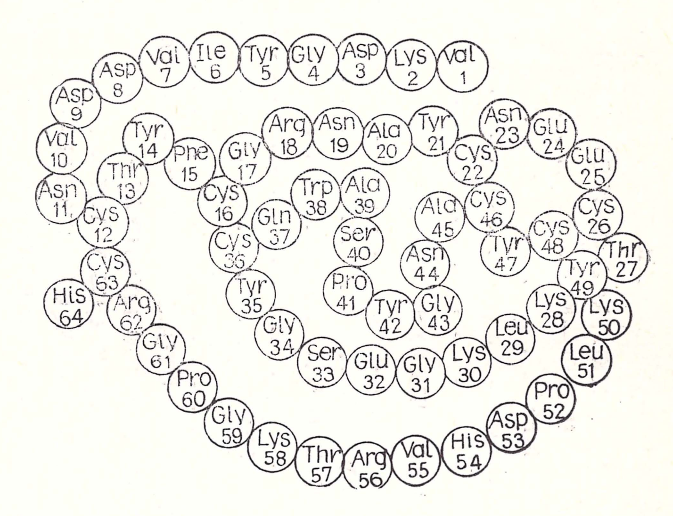



Схема 2. Ковалентная структура токсина А II из яда скорпиона Androctonus australis (Kupeyan et al., 1974).

Структурное сходство выделенных к настоящему времени токсинов для млекопитающих достаточно выражено, а число замен отдельных аминокислотных остатков не превышает 14% и представляется малосущественным. Такие токсины, определяемые как «изотоксины», или токсические варианты, различаются по степени амидирования дикарбоновых аминокислотных остатков или даже единственным аминокислотным остатком в определенной позиции. Так, описаны препараты токсинов, представляющие собой смесь двух изотоксинов, отличающихся друг от друга присутствием в положении 17 валина и изолейцина (Miranda et al., 1970; Rochat et al., 1970). В то же время сравнительный анализ первичной структуры токсинов для млекопитающих выявляет более глубокие

отличия, что позволяет разделить все известные к настоящему времени токсины на 4 группы (Орлов и др., 1977).

Первую группу образуют полипептиды, характеризующиеся наличием аминокислотных остатков между 2-м и 3-м полуцистинами и имеющие высокую летальную активность.

Токсины второй группы тоже достаточно активны и примерно на 50% гомологичны полипептидным токсинам первой группы.

Токсины третьей группы обладают заметно меньшей летальной активностью и в меньшей степени гомологичны полипептидам из двух первых групп.

Наконец, токсины четвертой группы наименее активны и обнаруживают небольшое структурное сходство с другими токсинами из ядов скорпионов.

Перечисленные группы токсинов показаны на схеме 1. Пока невозможно судить о принадлежности токсинов из ядов среднеазиатских скорпионов к одной из четырех перечисленных выше групп. Однако анализ их аминокислотного состава указывает на ряд особенностей, позволяющих предположить, что по структуре они должны отличаться от известных полипептидных токсинов из ядов других видов скорпионов. Изоморфизм токсинов может быть использован в таксономических целях: так, отличия в аминокислотных последовательностях токсинов яда скорпиона A. australis вызвали предположение о существовании 2 подвидов этого вида скорпионов, что впоследствии нашло подтверждение в морфологических наблюдениях, проведенных с целью систематики (Zlotkin, 1973).

Опыты по направленной модификации молекул токсинов скорпиона с целью выяснения функционально и структурно существенных групп пока немногочисленны, а их результаты трудно интерпретировать. Для физиологов большой интерес представляют способы введения в токсины метки. Показано (Rochat et al., 1972), что при йодировании остатков тирозина токсины скорпиона не теряют активности. Другой вариант представлен работами Ismail et al. (1974), в которых предварительно получали меченый по $^{125}I$ или по $^{131}I$ яд, а затем выделяли из него соответственно меченые токсины.

**Токсины для насекомых (insect toxins).** Обнаружение в ядах скорпионов токсинов с селективной активностью для насекомых представляет существенный интерес для сравнительной физиологии, занимающейся изучением особенностей организации и функционирования нервной системы у животных различных систематических групп. Определено (Zlotkin et al., 1972), что яд скорпиона вызывает контрактурный паралич личинок насекомых и их гибель, причем, судя по результатам электрофореза, компоненты, с которыми связаны 2 этих эффекта яда, могут быть дифференцированы и, несомненно, отличаются от полипептидов, токсически действующих на теплокровных. Пока не ясно, содержатся ли в яде скорпионов токсины для насекомых, различающиеся по спо-

собу действия и конечному эффекту, однако отличия в физико-химических свойствах и строении инсектотоксинов, присутствующих в одном яде, уже зафиксированы и могут быть подробно рассмотрены на примере яда среднеазиатского скорпиона Buthus eupeus.

Ниже сообщаются результаты работы, выполненной в Институте биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР (Солдатова, 1977; Атакузиев, 1978). Этапы выделения чистых токсинов для насекомых из цельного яда скорпиона показаны в

Таблица 3

**Аминокислотный состав токсинов для насекомых из ядов скорпионов B. eupeus и A. australis H. (по Zlotkin et al., 1971; Солдатова, 1977)**

| Аминокислоты | Токсины из ядов скорпионов | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | A. australis H. | B. eupeus | | | |
| | AL | $И_1$ | $И_2$ | $И_3$ | $И_4$ |
| Asp | 11 | 2 | 11 | 3 | 5 |
| Thr | 4 | 2 | 2 | 3 | 2 |
| Ser | 6 | — | 6 | — | — |
| Glu | 3 | 3 | 1 | 2 | 1 |
| Pro | 1 | 3 | 2 | 1 | 2 |
| Gly | 4 | 4 | 7 | 5 | 4 |
| Ala | 3 | 2 | 2 | 1 | 1 |
| 1/2 Cys | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 |
| Val | 3 | — | 1 | — | — |
| Met | — | 3 | — | 2 | 3 |
| Ile | 2—3 | — | 3 | — | — |
| Leu | 5—6 | 1 | 3 | 1 | 1 |
| Tyr | 5 | 1 | 4 | 1 | — |
| Phe | 1 | 2 | 1 | 2 | 2 |
| His | 1 | — | — | 1 | 1 |
| Lys | 7 | 2 | 8 | 1 | 3 |
| Arg | 1 | 3 | — | 5 | 2 |
| Trp | 1 | — | 3 | — | — |
| Всего | 67 | 36 | 62 | 36 | 35 |
| N-концевая | Lys | Met | Ala | Met | Met |

табл. 1 Полученные инсектотоксины вызывали у насекомых паралич и в совокупности обладали только 26% общей активности яда к насекомым. По молекулярным размерам они относятся к 2 группам: 3 инсектотоксина ($И_1$, $И_3$ и $И_4$) с молекулярным весом около 4000 дальтон и 1 ($И_2$) с 7000. В табл. 3 аминокислотные составы «коротких» и «длинного» токсинов из яда скорпиона Buthus eupeus сопоставлены с составом инсектотоксина яда скорпиона Androctonus australis H. (Zlotkin et al., 1971).

Подобно токсинам для теплокровных, инсектотоксины содержат по 8 остатков полуцистинов, замкнутых четырьмя дисуль-

И$_1$ MCMPCFTTRPDMAQQCRACCKGRGKCFGPQCLCGYD

И$_2$ ADGYVKGKSGCKISCFLDNDXCNADCKYYGGKSGYCWCPNK?LNSWCIPDK, GWBSIKSETNTC . . . . . . . . . .

И$_4$ MCMPCFTTBBXRACK . . . . . . . . . . . . .

AL KKNGYAVDSSKKAPE . . . . . . . . . . . . .

A I KRDGYIVYPNNCVYHCVPP . . . . . . . . . .

A III VRDGYIVNSKNCVYHCVPP . . . . . . . . . .

Схема 3. Аминокислотные последовательности инсектотоксинов (И$_1$, И$_2$, И$_4$) из яда среднеазиатского скорпиона B. eupeus, инсектотоксина (AL) и токсинов для млекопитающих (A I, A III) из яда скорпиона A. australis H.

Аминокислотные остатки обозначены однобуквенным кодом IUPAC. Подчёркнуты участки предположительной „стыковки“ пептидов. X—неидентифицированные остатки. Более полные аминокислотные последовательности токсинов AI и AIII показаны на схеме 1.

фидными связями. Такая же структурная особенность характерна для нейро- и цитотоксических полипептидов из ядов элапидовых змей (Туракулов и др., 1971; Юкельсон и др., 1974; Karlsson, 1979). Короткие токсины отличаются от длинных, содержащихся в ядах скорпионов B. eupeus и A. australis H., низким содержанием тирозина, серина, остатков гидрофобных аминокислот (валина, лейцина, изолейцина), полным отсутствием триптофана и наличием метионина. Отсутствие триптофана и содержание метионина сближают короткие инсектотоксины с цитотоксинами из ядов аспидовых змей (Юкельсон, 1977; Karlsson, 1979).

Сравнительный анализ аминокислотного состава позволяет заключить, что короткие инсектотоксины яда B. eupeus представляют новые структурные варианты полипептидов с аналогичной функцией, причем все они, по-видимому, являются изотоксинами (Солдатова, 1977). Длинные токсины $И_2$ из яда B. eupeus и AL из яда A. australis H. обнаруживают большое сходство в аминокислотных составах; незначительные вариации в числе отдельных аминокислотных остатков могут быть обусловлены разной длиной их полипептидных цепей (62 и 67 остатков соответственно). На схеме 3 короткие и длинные инсектотоксины ядов скорпионов B. eupeus и A. australis H. сопоставлены по аминокислотным последовательностям с токсинами для млекопитающих из яда скорпиона A. australis H. Уже сравнение N-концевых участков полипептидных цепей указывает на весьма отдаленное сходство сравниваемых селективных токсинов. Этот вывод находится в соответствии с результатами, обнаруживающими отличия в физико-химических свойствах токсинов для млекопитающих и насекомых: так, в отличие от основных токсинов для млекопитающих, инсектотоксины характеризуются слабой катодной подвижностью при электрофорезе в щелочных буферных средах и имеют pI около 7,0 (Zlotkin et al., 1974; Орлов и др., 1977).

**Токсины для ракообразных (crustation toxins)**. Яд скорпиона эффективно парализует ракообразных, однако этот эффект практически не воспроизводят чистые токсины для млекопитающих и насекомых. Предположение о существовании в яде скорпионов самостоятельного токсина для ракообразных было подтверждено выделением такого токсина с помощью рециклической гельфильтрации на сефадексе G-50 (Zlotkin et al., 1972). Токсин для ракообразных тоже оказался полипептидом с молекулярным весом около 8000 дальтон. Он состоит из 69 аминокислотных остатков, в нем отсутствуют метионин, фенилаланин, гистидин, но содержится значительное число остатков аргинина. В соответствии с этим молекула токсина для ракообразных характеризуется ярко выраженными осно́вными свойствами. Предполагают, что структуру токсина стабилизируют 5 дисульфидных связей (Zlotkin et al., 1975).

## МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ТОКСИНОВ ЯДОВ СКОРПИОНОВ

Детальный физиологический анализ действия яда скорпионов (Орлов и др., 1977) позволяет заключить, что в разнообразных фармакологических эффектах цельных ядов пусковым моментом является деполяризация возбудимых мембран из-за вызванного ядами увеличения входящего натриевого тока. В связи с обнаружением в ядах скорпионов селективных токсинов возникает вопрос, насколько такой механизм действия универсален и присущ всем токсинам. В литературе приводятся данные, что токсин для теплокровных не блокирует синаптическую передачу в брюшной нервной цепочке таракана, тогда как инсектотоксин действует с активностью, в 267 раз превышающей активность цельного яда (D,Ajello et al., 1972). С другой стороны, токсины для насекомых и млекопитающих оказались не эффективными на рецепторе растяжения рака, тогда как токсин для ракообразных полностью воспроизводил на этом препарате возбуждающий и тормозной эффекты цельного яда скорпиона (Pansa et al., 1973). Летальная активность инсектотоксинов не реализуется в отношении пауков (Zlotkin et al., 1971), тогда как различные токсины для млекопитающих и токсин для ракообразных прекрасно действуют на нервно-мышечные препараты тарантулов (Орлов и др., 1977).

Ruhland et al. (цит. по Орлову и др., 1977), количественно оценив эффективность действия селективных токсинов на нервно-мышечные препараты животных из разных систематических групп, показали относительность самого понятия селективности в приложении к токсинам скорпионов: абсолютной избирательностью в отношении насекомых обладают только инсектотоксины, которые не действуют на ракообразных, пауков и млекопитающих; остальные токсины (для млекопитающих и ракообразных) действовали повсеместно, включая и насекомых, но с большей активностью в отношении животных из соответствующих им систематических групп.

Приведенное выше представление о влиянии на натриевый канал возбудимых мембран как молекулярной основе механизма действия в основном базируется на результатах, полученных при использовании цельных ядов скорпионов или выделенных из них токсинов для млекопитающих (Koppenhöfer, Schmidt, 1968 а, б; Gomes et al., 1973; Narahashi, 1974; Romey et al., 1975). Указывается также, что в представляющей канал молекуле пространственно разнесены участки связывания токсинов скорпионов и других взаимодействующих с натриевым каналом агентов, например аконитина, тетродоксина и т. д. (Орлов и др., 1977; Можаева и др., 1978). Благодаря этому токсин скорпиона можно признать совершенно самостоятельным и абсолютно уникальным «инструментом» для изучения натриевого канала. Если же признать, что описанный механизм действия свойственен всем содержащимся в яде скорпионов токсинам, а абсолютная или относительная се-

лективность этих токсинов обусловлена только структурными особенностями тканей или расположенного в них ионофора у разных животных, то использование токсинов скорпионов для целей сравнительной и эволюционной физиологии нервной системы приобретает особенно большие перспективы.

## ЛИТЕРАТУРА


Атакузиев Б. У. 1978. Исследование токсинов для млекопитающих в яде среднеазиатского скорпиона Buthus eupeus. Автореф. канд. дис. Ташкент.
Атакузиев Б. У., Юкельсон Л. Я., Ташмухамедов Б. А. 1974. ХПС, № 4, 540—541.
Орлов Б. и др. 1977. «Механизм действия зоотоксионов», вып. 5. Горький, 3.
Пигулевский С. В. 1975. Ядовитые животные. Токсикология беспозвоночных. Л.
Солдатова Л. 1977. Структурная характеристика инсектотоксинов из яда скорпиона Buthus eupeus. Автореф. канд. дис. М.
Туракулов Я. Х., Сорокин В. М., Нишанходжаева С. А., Юкельсон Л. Я. 1971. «Биохимия», **36**, № 6, 1282—1287.
Юкельсон Л. Я., Садыков Э. С., Сорокин В. М. 1974. «Биохимия», **39**, № 4, 816—821.
Юкельсон Л. Я. 1977. Мембраноактивные компоненты яда среднеазиатской кобры: цитотоксины и фосфолипазы $A_2$. Автореф. докт. дис. Ташкент.
Adam K. R., Weiss C. 1956. Nature. **178**, 4530, 421.
Adam K. R., Weiss C. J. 1958. J. Exp. Biol., **35**, 39.
Adam K. R., Weiss C. 1959. Brit. J. Pharmacol., **14**, 334.
Albuquerque E. X., Eldefrawi A. T., Eldefrawi M. E. 1979. In: «Shake Venoms» (Ch. Yu. Lee ed.). Handbook of Experimental Pharmacology, v. 52. Springer — Verlag. 377—402.
Babin D. R. et al. 1974. Arch. Biophys., **164**, 694—706.
Babin D. R. et al. 1975. Arch. Biochem. Biophys., **166**, 125—134.
Babu S., Krishna Dass K. P. M., Venkatachari S. A. T. 1971. Toxicon, **9**, 119—124.
Balozet L. 1956. In: «Venoms» (E. E. Buckley, N. Porges eds.). AAAS, Washington D. C., 441, 44—46.
Bdolah A. 1979. In: «Snake Venoms» (Ch. Yu. Lee eds.). Handbook of Experimental Pharmacology, v. 52. Springer—Verlag, 41—60.
Bhaskaran Nair R., Kurup P. A. 1973. Ind. J. Biochem. and Biophys., **10**, 230—231.
Bhaskaran Nair R., Kurup P. A. 1973. Ind. J. Biochem. and Biophys., **10**, 133—134.
Bhaskaran Nair R., Kurup P. A. 1975. Biochim. Biophys. Acta, **381**, 165—174.
Bolivar J., Rodriguez G. 1953. J. Ciencia Mexica, **12**, 277.
Bolivar J., Rodriguez G. 1953. Chem. Abstr., **48**, 468—474.
Catterall W. A. 1976. J. Biol. Chem., **251**, 5528—5536.
Chicheportiche K., Lazdunski M. 1970. Eur. J. Biochem., **14**, 549.
D'Ajello V. et al. 1972. Toxicon, **10**, 399—404.
Diniz C. R., Goncalves J. M. 1956. In: «Venoms» (E. E. Buckley, N. Porges eds.), AAAS, Washington D. C. 131—139.
Diniz C. R., Goncalves J. M. 1960. Biochim. Biophys. Acta, **41**, 470—477.
El Asmar M. F., Ibrahim S. A., Rabie F. 1972. Toxicon, **10**, 73—77.
Freire-Maia L., Ribeiro R. M., Beraldo W. T. 1970. Toxicon,, **8**, 307—310.
Gomez M. V., Diniz C. B. 1966. Mem. Inst. Butantan, **33**, 899.
Gomez M. V., Dai M. F. M., Diniz C. R. 1973. J. Neurochem., **20**, 1051—1061.
Hahn H. P. von, Honegger C. G. 1974. Experientia, **30**, 2—7.
Ibrahim S. A. 1967. Toxicon, **5**, 59—60.

Ismail M., Kertesz G., Osman O. H., Sidra M. S. 1974. Toxicon, 12, 209—211.
Ismail M., El Asmar M. F., Osman O. H. 1975. Toxicon, 13, 49—56.
Handbook of Experimental Pharmacology, v. 52. Springer—Verlag. 159—212.
Karlsson E. 1973. Experientia, 29, 1319.
Karlsson E. 1979. In: «Snake Venoms» (Ch. Yu Lee ed.).
Koppenhôfer E., Schmidt H. 1968. Experientia, 24, 41.
Koppenhöfer E., Schmidt H. 1968. Pflügers Arch., 303, 133(a), 150(b).
Kupeyan C. et al. 1974. Eur. J. Biochem., 47, 483—489.
Lindon C. D., Raftery M. A. 1976. Biochem. Biophys. Res. Commun., 72, 646—653.
Lissitzky S. et al. 1956. Compt. Rend. Sc. Paris, 150, 741—743.
Master R. W. P., Rao S. S., Soman P. D. 1963. Biochim. Biophys. Acta, 71, 422—428.
McIntosh M. E., Watt D. D. 1967. Instint. Symp. Toxicon, 4, 297.
McIntosh M. E., Watt D. D. 1970. Toxicon, 8, 142.
McIntosh M. E., Watt D. D. 1972. In: «Toxins of Animal and Plant Origin», v. 2 (Vries A. de, Kochwa E. eds.). Gordon and Breach Sci Publ. N. Y. e. a. p. 523—544.
McIntosh M. E., Watt D. D. 1973. In: «Toxins of Animal and Plant Origin», v. 3 (Vries A. de, Kochwa E. eds.). Gordon. and Breach Sci Publ. N. Y. e a. p. 529.
Mebs D. 1973. Experientia, 29, 1328—1334.
Miranda F., Lissitzky S. 1958. Biochim. Biophys. Acta, 30, 217—218.
Miranda F., Rochat H., Lissitzky S. 1960. Bull. Soc. Chim. Biol., 42, 379.
Miranda F., Lissitzky S. 1961. Nature, 190, 443.
Miranda F., Rochat H., Lissitzky S. 1961. Bull. Soc. Chim. Biol., 43, 945—952.
Miranda F., Rochat H., Lissitzky S. 1962. J. Chromatogr., 7, 142.
Miranda F., Rochat H., Lissitzky S. 1964. Toxicon, 2, 51—69, 123.
Miranda F. et al. 1966. Toxicon, 4, 123—144.
Miranda F. et al. 1970. Eur. J. Biochem., 16, 514—523.
Miranda F. et al. 1972. In: «Toxins of Animal and Plant Origin», v. 2, (Vries A. de, Kochwa E. eds.). Cordon and Breach Sci. Publ. N. Y., e. a. 251.
Monamed A. H., Kamel A., Ayobe M. H. 1969. Toxicon, 6, 293.
Narachashi T. 1974. Physiol. Rev., 54, 813—889.
Nitzan M., Miller-BenShaul D., Shulov A. 1963. Israel J. exp. Med., 11, 54.
Nitzan M., Shulov A. 1966. Toxicon, 4, 17.
Nitzan M. 1970. Toxicon, 8, 245—246.
Oomen P. H., Kurup P. A. 1964. Ind. J. Exp. Biol., 2, 78—80.
Osman O. H. et al. 1972. Toxicon, 10, 363—366.
Pansa M., Natalizi G., Bettini S. 1973. Toxicon, 11, 283.
Rao S. S., Kapadia Z. S., Master R. W. P. Ind. J. Exp. Biol., 2, 75.
Rochat C. et al. 1967. Biochemistry, 6, 578—585.
Rochat H. et al. 1970. Eur. J. Biochem., 17, 262—266.
Rochal H. et al. 1970. FEBS Lett., 10, 349.
Rochat C. et al. (1972. Biochimie, 54, 445—449.
Rochat (Habersetzer) C., Sampieri F. 1976. Biochemistry, 15, 2254—2261.
Romey G. et al. 1975. Biochem. Biophys. Res. Commun., 64, 115—121.
Rosin R. 1969. Toxicon, 7, 75.
Russell F. E., Alender S. B. 1967. Fed. Proc., 26, 321.
Russell F. E., Alender C. B., Buess F. W. 1968. Science, 159, 90.
Tarabini-Castellani G. 1938. Arch. Hal. Med. Sper., 2, 969,
Watt D. D. 1964. Toxicon, 2, 171—180.
Watt D. D., Babin D., Mlejnek R. 1974. J. Agr. Food. Chem., 22, 43.
Weissmann A., Shulov A., Shafrir E. 1958. Experientia, 14, 175—176.

Welsh J., Batty C. 1963. Toxicon, 1, 165.
Zlotkin E., Shulov A. 1969. Toxicon, 7, 331—332.
Zlotkin E. et al. 1971. Biochimie, 53, 1073—1078.
Zlotkin E., Miranda F., Lissitzky S. 1972. Toxicon, 10, 207—209.
Zlotkin E., Miranda F., Lissitzky S. 1972. Toxicon, 10, 211.
Zlotkin E. 1973. Experientia, 29, 1453.
Zlotkin E. et al. 1975. Insect Biochem., 5, 243—250.

М. М. РАХИМОВ, Ш. Р. МАДЬЯРОВ

# РОЛЬ ФАЗОВЫХ СОСТОЯНИЙ ФОСФОЛИПИДОВ В РЕГУЛИРОВАНИИ КАТАЛИТИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ФОСФОЛИПАЗ В ИСКУССТВЕННЫХ И МЕМБРАННЫХ СИСТЕМАХ

В последние годы возрос интерес к изучению липолитических ферментов, особенно фосфолипаз. Это объясняется тем, что, во-первых, фосфолипазы, представляющие большую группу ферментов, участвующих в каталитических превращениях фосфолипидов, играют важную роль в контроле биосинтеза простагландинов, во-вторых, фосфолипазы катализируют превращение своих субстратов на границе раздела фаз и могут поэтому служить хорошей моделью для изучения закономерностей гетерогенных ферментативных процессов — наиболее широко распространенного, но наименее изученного вида каталитических процессов в биологических системах. В качестве третьей причины можно назвать то, что фосфолипазы могут изменять свою каталитическую активность, а иногда и специфичность в зависимости от физического состояния субстратной фазы. Это имеет важное значение, так как изменение состояния субстрата (подавляющее количество субстратов фосфолипаз локализовано в мембранах) может активно регулировать каталитическую активность мембранных ферментов. Кроме того, фосфолипазы сами активно воздействуют на биологические мембраны и могут использоваться в качестве своеобразных «инструментов» для выяснения взаимосвязи «структура — функция» при исследовании функций мембран, мембранных фосфолипидзависимых ферментов и полиферментных систем.

Большой интерес представляет также выяснение роли эндогенных фосфолипаз в регуляции мембранной целостности. Наконец, еще один аспект в изучении фосфолипаз — это их способность катализировать процессы трансацилирования и трансалкилирования. Детальное исследование этой функции фосфолипаз позволит разработать ферментативный синтез фосфолипидов, в том числе и не встречающихся в реальных биологических системах. Это особенно актуально в связи с тем, что их химический синтез многостадийный и довольно трудоемок.

## ХАРАКТЕРИСТИКА ФОСФОЛИПАЗ

Фосфолипазы катализируют гидролиз водонерастворимых субстратов — фосфолипидов и представляют собой особую группу в многообразии липолитических ферментов, различающихся физико-химическими свойствами и специфичностью. В зависимости от того, какая из сложноэфирных связей субстрата подвергается гидролизу, фосфолипазы разделяют на 4 типа — А, В, С и Д (Van Deenen et al., 1966; Lowenstein, 1969; Hanahan, 1971). Ниже схематически показано, каким образом различаются фосфолипазы в реакции гидролиза лецитина и лизолецитина.



Гидролиз сложноэфирной связи в $\alpha$- и (или) в $\beta$-положении в молекулах фосфолипидов катализируется фосфолипазой А (фосфатидилхолин-ацилгидролаза КФ 3.1.1.4). В результате реакции от молекулы фосфолипида отщепляется жирная кислота и образуются соответствующие лизофосфолипиды (Kates, 1960). Фосфолипаза А встречается преимущественно в объектах животного происхождения (Scherphof, Van Deenen, 1965; Gallai-Hatchard, Tompson, 1965; Natter, Privet, 1966; De Haas et al., 1968) и микроорганизмах (Ono, Nojima, 1969 a, b). Различают 2 разновидности фосфолипазы А в зависимости от положения отщепляемых ацильных остатков в фосфолипидах: фосфолипаза $A_1$ проявляет специфичность к гидролизу сложноэфирной связи в $\alpha$-положении (Fung, Proulx, 1969; Scandella, Kornberg, 1971; Raybin et al., 1972; Van Den Bosch et al., 1974), а фосфолипаза $A_2$ специфическим образом отщепляет жирнокислотный остаток в $\beta$-положении (Wells, Hanahan, 1969; Wu, Tinker, 1969; Waite, Sisson, 1971). Фосфолипаза $A_2$ обладает более высокой специфичностью по отношению к расщепляемой связи в фосфоглицеридах, чем фосфолипаза $A_1$. Некоторые из препаратов фосфолипазы $A_1$ являются более активными по отношению к 1-лизофосфоглицеридам, чем по отношению к диацильным соединениям, и поэтому могут также называться лизофосфолипазами (Van Den Bosch, 1974).

Наименьшей специфичностью к положению гидролизуемой ацильной связи обладает фосфолипаза В (КФ 3.1.1.5), которая полностью деацилирует диацилфосфоглицериды и моноацилфосфоглицериды (Hayaishi, Cornberg, 1954; Banham, Dawson, 1959;

Beare, Kates, 1967). Фосфолипаза В, также как и фосфолипаза А, распространена в животном мире и микроорганизмах. В литературе встречаются и другие названия этих ферментов (лизолецитиназа, лизофосфолипаза, фосфатидгидролаза и т. д.), что иногда вызывает определенные трудности при интерпретации результатов и отнесении определенной фосфолипазы к тому или другому виду (Brockerhoff, Jensen, 1974). Различия между фосфолипазой В и лизофосфолипазами описаны в обзоре Van Den Bosch (1974).

Фосфолипаза С (Pastan et al., 1968; Lowenstein, 1969; Kleiman, Lands, 1969; Doy, Nojima, 1971; Gatt, Barenholz, 1973) (фосфатидилхолин-фосфохолингидролаза КФ 3.1.3.4) и фосфолипаза *D* (Hanahan, Chaikoff, 1947; Kates, 1954; Davidson, Long, 1958; Kates, 1960; Lowenstein, 1969) (фосфатидилхолин-холингидролаза КФ 3.1.4.4) способны осуществлять гидролиз как фосфолипидов, так и лизофосфолипидов и различаются между собой тем, что первая гидролизует связь между глицеридной частью и остатком фосфорилированного основания (например, фосфохолина в молекуле лецитина), а вторая образует фосфатидиловую кислоту, отщепляя от молекулы фосфолипида соответствующий спиртовый остаток (например, холин от лецитина). Исследованные до сих пор препараты фосфолипазы С выделены из микроорганизмов. Однако нельзя считать, что отсутствие фермента в растениях и органах животных доказано. По-видимому, недостаток экспериментальных данных не позволяет сделать этот вывод. Фосфолипаза *D* до недавнего времени также считалась ферментом, присущим только растительным объектам, однако появились сообщения о присутствии этого фермента в некоторых микроорганизмах и клетках животных (Ono, White, 1970; Soušek et al., 1971; Saito, Kanfer, 1973; Wykle et al., 1974, 1980).

Свойства фосфолипаз А, В и С и их функциональная характеристика описаны в многочисленных обзорах. В то же время исследования по фосфолипазе Д недостаточно освещены в литературе. В последнее время появились новые сведения, в значительной степени изменившие наши представления об этом ферменте, поэтому необходимо обобщение достижений в области изучения фосфолипазы *D*.

Ферментативный гидролиз лецитина с образованием фосфатидиловой кислоты и азотистого основания впервые обнаружен в 1947 г. Hanahan, Chaikoff (1947 a, b). Они показали, что водные экстракты корнеплода моркови и листьев капусты способны ускорять гидролиз фосфолипидов. Позднее эти результаты были подтверждены работами Ducet (1949), Rose (1950), Acker et al. (1952) и Smith (1954). Авторы определили, что фосфолипаза этого типа широко распространена в растениях. Более систематические исследования проводились начиная с 1954 г., когда Kates опубликовал данные о внутриклеточной локализации лецитиназы (фосфолипаза *D*) некоторых растений. Он установил, что фермент, гидролизующий лецитин в растительных экстрактах, тесно связан

с пластидными фракциями и полностью отсутствует в цитоплазматических фракциях. Несколько позже Tookey, Balls (1956) сообщили о получении водорастворимой фосфолипазы Д из обезжиренной муки семян хлопчатника.

Присутствие растворимой формы фосфолипазы *D* в листьях капусты и органах ряда других растений определили Davidson, Long (1958). Среди исследованных ими объектов наиболее высокое содержание фосфолипазы обнаружено в листьях савойской и побегах брюссельской капусты. В этих растениях наряду с водорастворимой формой присутствовала и частичная форма фермента, описанная Kates (1954).

Einset, Clark (1958) выделили растворимый фермент из моркови.

Heller et al. (1968) установили высокую активность фосфолипазы *D* в семенах арахиса и изучили динамику превращения одной формы (связанной с митохондриями) в другую (растворимую фосфолипазу *D*). Более детальное исследование этих взаимопревращений проведено Talwalkar et al. (1969) при изучении фосфолипазы *D* из семян кофе. По данным этих авторов, фосфолипаза *D* локализована в частичной фракции, осаждаемой при 18000 об/мин. Некоторое количество связанного с частицами фермента (до 50% по активности) может быть солюбилизировано экстракцией водным буфером при pH 7,2 после обработки семян ацетоном или обработкой ультразвуком водной дисперсии частиц, содержащих фосфолипазу *D*. В этих же условиях возможна солюбилизация фосфолипазы *D* в экстракте из моркови. Авторы пришли к выводу, что растворимая фосфолипаза *D* представляет собой солюбилизированную форму фермента из хлоропластов.

Quarles, Dawson (1969), изучая распределение этого фермента в различных органах растений, сделали вывод, что фосфолипаза *D* является водорастворимым ферментом. Растворимая форма фосфолипазы *D* выделена и из семян хлопчатника (Мадьяров, 1976, 1977). Показано отсутствие фермента во фракциях митохондрий, хлоропластов и микросом (Рахимова и др., 1976, 1970). Гомогенная растворимая фосфолипаза *D* из савойской капусты получена Allgyer, Wells (1979). В последнее время появились работы (Rouqhan, Slack., 1976; Рахимов, Мадьяров, 1977), авторы которых склонны считать водорастворимую фосфолипазу *D* артефактом (обсуждение этого вопроса см. ниже).

Существование 2 форм фермента — растворимой и связанной с клеточными частицами — установлено также для фосфолипазы *D* низших растений и микроорганизмов. Так, фосфолипаза *D* красных водорослей прочно связана с мембранами клетки и не может быть солюбилизирована даже обработкой ультразвуком (Antia et al., 1970). Фосфолипаза *D* в микроорганизмах Haemophilus parainfluenzae (Ono, White, 1970), Physarum policephalum (Comes, Kleinig, 1973) и Esherishia coli (Cole et al., 1974) локализована в частицах, а фосфолипаза D Corynebacterium Ovis (Soušek

et al., 1971), Streptomices hachionsis (Okawa, Yamaguchi, 1975) и Streptomices chromofuscus (Imamura, Horiuti, 1979) выделена в растворимой форме (табл. 1).

Присутствие фосфолипазы *D* в тканях животного происхождения обнаружено относительно недавно. Taki, Matsumoto (1973) обнаружили этот фермент в микросомах печени, а Saito, Kanfer (1973) — в микросомах клеток мозга. В первой работе не было установлено, является ли фосфолипаза *D* печени растворимым или частичным ферментом, так как вывод о существовании фосфолипазы *D* был сделан на основании исследования меченных in vivo фосфолипидов. В исследованиях Saito et al. (1973, 1975 a, b) показано, что для солюбилизации фосфолипазы *D* из мембран необходима обработка детергентами и что связь фермента с фосфолипидами мембран является прочной (Saito et al., 1975 b). В микросомах мозга также обнаружена лизофосфолипаза *D*, связанная с липидной фракцией (Wykle, Schraemmer, 1974). Вполне вероятно, что этот фермент также является фосфолипазой *D*, так как известно, что фосфолипаза *D* обладает значительной лизофосфолипазной активностью (Long et al., 1967 a, b). Таким образом, можно считать установленным, что фосфолипаза *D* широко распространена не только в растительном мире, но и в микроорганизмах и объектах животного происхождения. В табл. 1 суммированы данные о наиболее изученных фосфолипазах *D*.

Очищенные субстраты гидролизуются фосфолипазой *D* с незначительной скоростью, сравнимой со скоростью неферментативного гидролиза фосфолипидов. Как видно из данных табл. 1, почти все изученные фосфолипазы *D*, за исключением фермента из Corynebacterium ovis, требуют для проявления каталитической активности определенных активаторов, которыми могут служить органические растворители, детергенты, силикагель, ионы металлов.

Диэтиловый эфир — один из наиболее широко используемых активаторов фермента. Фосфолипаза *D* из мозга крысы является единственным ферментом, который ингибируется диэтиловым эфиром (Saito et al., 1975 b). Остальные известные до сих пор препараты фосфолипазы *D* независимо от источника выделения, молекулярного веса и других параметров активируются в водных растворах в присутствии диэтилового эфира. Способность эфира инициировать реакцию гидролиза лецитина в системах, содержащих фосфолипазу *D*, установлена Hanahan (1952).

Kates (1953, 1954) подробно изучил активацию диэтиловым эфиром фосфолипазы *D*, связанной с хлоропластами, и показал, что существует оптимальное соотношение водной и органической фаз, при котором скорость гидролиза субстрата максимальна. Davidson, Long, (1958), а также Einset, Clark (1958) показали, что аналогичная зависимость наблюдается и для водорастворимой фосфолипазы *D*. Значительно позже Heller et al. (1968) представили данные, что метанол и ацетон также могут быть активаторами фосфолипазы *D* арахиса.

Таблица 1

**Некоторые свойства фосфолипазы *D* из различных источников**

| Источник фосфолипазы *D* | Форма фермента | Специфич. субстрат | Оптимум pH | Активаторы фермента | Литературный источник |
|---|---|---|---|---|---|
| Растения | | | | | |
| Морковь (корнеплод) | Растворимая | Лецитин, азолектин | 5,5 | Эфир, $Ca^{+2}$ | Einset, Clark, 1958; Talwalkar et al., 1969 |
| | Связанная с пластидами | „ | 5,8 | Эфир | Kates, 954; Kates, 1955; Talwalkar et al., 1969 |
| Капуста (листья) | Растворимая | „ | 5,6 | $Ca^{+2}$, эфир, ДДС-Na | Davidson, Long, 1958; Dawson, Hemington, 1967; Quarles, Dawson, 1969 (a); |
| | Связанная с пластидами | „ | 5,5 | Фосфатидилинозит, эфир | Kates, 1954, 1955; Weis et al., 1959 |
| Шпинат (листья) | Растворимая | „ | | $Ca^{+2}$, эфир, ДДС-Na | Quarles, Dawson, 1969 (a); |
| | Связанная с пластидами | „ | 4,7 | Эфир | Kates, 1954; Kates, 1955 |
| Сахарная свекла (листья) | Растворимая | „ | — | $Ca^{+2}$, эфир, ДДС-Na | Quarles, Dawson, 1969 (a); |
| | Связанная с пластидами | „ | 4,7 | Эфир | Kates, 1954; Kates, 1955; |
| Хлопчатник (семена) | Растворимая | Лецитин | 5,6—6,0<br>5,6—7,4 | NaCl<br>Органические растворители, детергенты, силикагели | Tookey, Balls, 1956<br>Рахимов и др., 1970; Рахимов и др., 1976а, Рахимов и др., 1977а; Рахимов и др., 1976б; Рахимов и др., 1976в; Рахимов и др., 1976г, Рахимов и др. 1976д. |

Продолжение таблицы 1

| Источник фосфолипазы *D* | Форма фермента | Специфич. субстрат | Оптимум pH | Активаторы фермента | Литературный источник |
|---|---|---|---|---|---|
| Кофе (семена) | Растворимая | Фосфатиды кофе | 5,8 | $Ca^{+2}$, эфир | Talwalkar et al., 1969 |
| | Связанная с митохондриями | „ | 5,8 | „ | Talwalkar et al. 1969 |
| Арахис (семена) | Связанная с митохондриями и микросомами | Лецитин | 5,7 | $Ca^{+2}$, эфир, ацетон, детергенты | Heller et al, 1968 |
| | Растворимая | „ | 5,7 | „ | Heller et al, 1975 |
| Красные водоросли porphyridium creintum | Нерастворимая | „ | 7,0 | $Ca^{+2}$ | Antia et al., 1970 |
| Микроорганизмы Haemophilus parainfluenzae | Нерастворимая | Кардиолипин | 7,8 | $Mg^{+2}$, тритон X—100 | Ono, White, 1970; |
| Coryne bacterium ovis | Растворимая | Лизолецитин, сфингомиелин | 8,0 | Без активаторов | Souček et al., 1971 |
| Physarum polycephalum, Mcз V | Нерастворимая | Эндогенные фосфолипиды | — | Эфир, ДДС-Na | Comes, Kleinig, 1973 |
| Esherichia coli, B, (ATCC 11303) | Гомогенат | Кардиолипин | 7,3 | $Mg^{+2}$, АТФ | Cole et al., 1974 |
| Streptomyces hachijonsis | Растворимая | Фосфатидилэтаноламин | 7,5 | $Ca^{+2}$, $Mn^{+2}$, $Ca^{+2}$, тритон X—100 | Okawa, Yamaguchi, 1975 |
| Streptomyces chromofuscus | Растворимая | Сфингомиелин, лецитин, лизолецитин | 8,0 | $Ca^{+2}$, $Mg^{+2}$, эфир, тритон X—100 и др. | Imamura, Horiuti, 1979 |

Продолжение таблицы 1

| Источник фосфолипазы *D* | Форма фермента | Специфич. субстрат | Оптимум pH | Активаторы фермента | Литературный источник |
|---|---|---|---|---|---|
| **Животные** | | | | | |
| Крыса (мозг) | Нерастворимая | Фосфатидилэтаноламин | 7,2 | $Ca^{+2}$ $Mg^{+2}$ | Saito, Kanfer, 1973, 1975a; Wykle, Schraemmer, 1974; |
| Мышь (печень) | Связанная с микросомами | Лизофосфолипиды | 7,2 | $Ca^{+2}$ | Taki, Matsumoto, 1973 |
| Человек (эозинофилы) | Растворимая | L-α-фосфатидилхолин | 5,5 | $Ca^{+2}$ | Kanfer et al., 1976; |

Недавно были опубликованы работы (Рахимов и др., 1976 а, 1977 а; Мадьяров, Рахимов, 1977), в которых представлены результаты изучения поведения фосфолипазы D хлопчатника в присутствии органических растворителей различной природы: углеводородов, простых и сложных эфиров, ароматических соединений и др. Установлено, что активирование фосфолипазы D практически не происходило при использовании растворителей, смешивающихся с водой (ацетон, метанол, диоксан). Повышенные концентрации этих соединений ингибировали реакцию. В то же время большинство соединений, не смешивающихся с водой (гексан, бензол, циклогексан, толуол, октанол, хлорбензол, нитробензол, метилолеат, этилацетат и др.), приводили к активированию реакции, скорость которой иногда значительно превышала скорость реакции, достигаемой с диэтиловым эфиром в качестве активатора.

Различные детергенты также оказывают активирующее влияние на фосфолипазу D. Показано, что в большинстве случаев повышение активности связано с диспергированием субстрата и увеличением вследствие этого поверхности субстратной фазы, необходимой для адсорбции фермента (Dawson, Hemington, 1967; Рахимов и др., 1970). Изучено влияние додецилсульфата натрия, солей дезоксихолевой и таурохолевой кислот, фосфатидиловой, моноцетил- и дицетилфосфорной кислот, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилинозита, кардиолипина, сапонина, тритона Х-100, бромистого цетилтриметиламмония, стеариламина и пальмитоилхолина на активность фосфолипазы D (Dawson, Hemington, 1967; Chen, Barton, 1971). Среди перечисленных соединений, додецилсульфат натрия (ДДС) является не только наиболее эффективным ак-

тиватором, но и имеет некоторые отличительные особенности, обусловившие повышенный интерес к этому активатору.

Уже в ранних работах Kates (1954) показал, что ДДС, подобно диэтиловому эфиру, способен активировать фосфолипазу *D*. По его данным, ДДС менее эффективен, чем диэтиловый эфир, в опытах с частичной формой фосфолипазы *D* из капусты. Позднее, при изучении водорастворимой фосфолипазы *D* из того же объекта Dawson, Hemington (1967) нашли, что ДДС значительно превосходит по активирующему действию диэтиловый эфир и является самым эффективным активатором среди исследованных ими соединений. Активность ферментов в присутствии ДДС превышала более чем в 2 раза активность фермента с диэтиловым эфиром; наибольшая активность достигалась при молярном соотношении субстрат: активатор 2:1. В этих условиях скорость реакции оставалась постоянной до гидролиза приблизительно 20% взятого в реакцию субстрата.

Близкие данные получены при изучении влияния ДДС на фосфолипазу *D* хлопчатника (Рахимов и др., 1976 а, в). Активация ДДС, по-видимому, не связана с диспергированием субстрата. Так, при измерении мутности лецитиновой суспензии при различных концентрациях ДДС определено, что концентрация детергента, необходимая для активации реакции, недостаточна для диспергирования субстрата (Dawson, Hemington, 1967). С другой стороны, тритон Х-100 и цетилтриметиламмоний бромид (ЦТМАБ), способные диспергировать лецитин, не могут быть активаторами фосфолипазы *D* из семян хлопчатника (Рахимов и др., 1976). Для фосфолипазы *D* из Streptomices Chromofuscus (Imamura, Horiuti, 1979) обнаружена сложная зависимость активности фермента от концентрации тритона Х-100 и дезоксихолата натрия. При низких концентрациях эти детергенты были ингибиторами, а при более высоких — активаторами микробной фосфолипазы, ДДС в концентрации 4 мМ полностью блокировал фермент.

Активирующее действие на фосфолипазу *D* оказывают также фосфатидиловая и моноцетилфосфорная кислота, причем активирующая способность фосфатидиловой кислоты и ДДС идентичны. Другие детергенты, такие как дицетилфосфорная кислота, фосфатидилсерин, кардиолипин, сапонин, дезоксихолат натрия, таурохолат натрия, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилинозитол, не активировали реакцию (Dawson, Hemington, 1967). В исследовании Weis et al. (1959) однозначно показано, что фосфатидилинозитол является эффективным активатором фосфолипазы *D*.

Подобные противоречия встречаются в литературе и при исследовании активирующего действия катионных детергентов. Так, сообщалось, что гидролиз лецитина ингибируется в присутствии бромистого цетилтриметиламмония, стеариламина или пальмитоилхолина при концентрации этих детергентов до 1 мМ (Dawson, Hemington, 1967). Противоположные результаты получены при изучении фосфолипазы *D* арахиса и хлопчатника. В первом случае

(Heller et al., 1968) бромистый цетилтриметиламмоний (цетавлон) вместо ингибирования проявлял активирующее действие аналогично ДДС. Во втором случае (Рахимов и др., 1976) обнаружено лишь незначительное активирующее действие цетавлона.

Фосфолипаза *D* нуждается при функционировании в ионах кальция. Этот вопрос неоднократно обсуждался в литературе и пока нет единого мнения о механизме действия $Ca^{2+}$ и других ионов металлов на каталитическую активность фермента.

## ОСОБЕННОСТИ ПРОТЕКАНИЯ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ НА ГРАНИЦЕ РАЗДЕЛА ФАЗ

Подавляющее большинство клеточных ферментов или полиферментных систем локализовано в мембранах. С другой стороны, многие химические соединения, которые должны подвергаться действию ферментов, не являются водорастворимыми и образуют отдельную фазу в водном растворе. Таким образом, большая часть огромного числа ферментативных реакций протекает в клетке на границе раздела фаз. Ситуация, сложившаяся в экзимологии в настоящее время, такова, что мы располагаем относительно полными сведениями для случая, когда фермент и вещество, подвергающееся превращению, являются водорастворимыми. Создан богатый арсенал методов и различных подходов для количественного описания катализа в таких гомогенных ферментативных системах. Этого, однако, нельзя сказать относительно ферментативных реакций, протекающих на границе раздела фаз. Такие реакции можно разбить на 2 большие группы: к первой относятся ферментативные процессы, в которых участвуют водорастворимые ферменты и нерастворимые субстраты в виде гидрофобных капель, мицелл, пленок, везикул или различных структурированных клеточных образований, ко второй — процессы, в которых ферменты представляют собой нерастворимую фазу, они либо встроены в мембраны, либо находятся в связанном с различными клеточными компонентами состоянии, а их субстраты представляют собой водорастворимые молекулы или комплексы.

Имеется целый ряд исследований, в которых ферменты связаны с неводной фазой, но они искусственно солюбилизированы и механизм их действия изучен в гомогенных условиях. Такие ферменты с полным основанием можно рассматривать как артефакты. Общим для обоих перечисленных выше случаев является то, что для протекания ферментативных реакций необходима локализация обоих компонентов (фермента и субстрата) на границе раздела фаз. Следовательно, одной из основных задач при исследовании механизма гетерогенного ферментативного катализа является изучение специфической локализации ферментов или субстратов на межфазных поверхностях и её влияние на протекание последующих стадий энзиматических реакций.

Хорошей моделью для изучения процессов, отнесенных нами к первой группе, является ферментативный липолиз, осуществляемый липазами и фосфолипазами. В этом случае необходима предварительная адсорбция водорастворимого фермента на поверхности субстратной фазы. Фосфолипаза *D*, аналогично другим липолитическим ферментам, осуществляет гидролиз сложноэфирной связи в гетерогенных условиях. Возможно, в данном случае фосфолипид выступает не только в роли субстрата ферментативной реакции, но и создает активную конформацию фермента и необходимого гидрофобного окружения, как это происходит в случае некоторых других ферментов, когда фосфолипиды не являются их субстратами: цитохромоксидаза и другие дыхательные ферменты, $Na^{+}$-, $K^{+}$-, $Ca^{+2}$-АТФазы (Fourcans, Jain, 1974; Рэкер, 1979), липаза печени (Okuda et al., 1969), триацетиназа семян хлопчатника (Землянская, 1979). Несмотря на то, что такая вероятность существует, липолитические ферменты, в том числе и фосфолипаза *D*, вплоть до настоящего времени не использовались в качестве простых моделей как для такого исследования, так и для выяснения общих принципов гетерогенного ферментативного катализа. Некоторые попытки в этом направлении предприняты лишь недавно (Quarles, Dawson, 1969 b; Рахимов и др., 1972; Verger et al., 1973; Wells, 1974; Рахимов, Мадьяров, 1977).

С кинетической точки зрения катализ с нерастворимыми субстратами должен протекать с меньшей скоростью, поскольку субстратные молекулы объединены в агрегаты, представляющие собой малоподвижные липидные образования, и процесс может лимитироваться подвижностью такого агрегата. Вследствие этого липолитические ферменты должны обладать значительно меньшей гидролитической активностью по сравнению с другими эстеразами. Имеется большое число исследований, в которых показано, что увеличения скорости липолиза можно достичь, создавая условия для лучшей адсорбции водорастворимого фермента на поверхности субстратной фазы. Обычно для этого используют диспергирование, мицелирование, эмульгирование, механические воздействия и т. д. (Desnuelle, 1972). Экспериментальные факты, однако, свидетельствуют, что липолиз может протекать в ряде случаев с достаточно высокой скоростью и иногда даже с гораздо большей, чем гидролиз сложноэфирной связи в гомогенном растворе (Brockerhoff, 1969). Следовательно, имеются какие-то особенности таких реакций, повышающие эффективность катализа.

При рассмотрении механизма липолиза можно предположить 2 варианта. Первый заключается в том, что липолиз протекает как обычная ферментативная реакция в водном растворе при действии фермента на те молекулы субстрата, которые переходят из липидной фазы в водную в соответствии с растворимостью субстрата. Второй предусматривает непосредственную адсорбцию фермента на поверхности субстратной фазы, когда гидролиз может осуществляться согласно пока неизвестному механизму, который

может быть общим для всех липолитических ферментов, либо специфичным для определенной липазы и фосфолипазы или группы липаз и фосфолипаз. Brockerhoff (1969, 1973) и другие исследователи (Рахимов и др., 1972; Verger et al., 1973; Wells, 1974) представили убедительные доказательства в пользу второго варианта.

В настоящее время предложено несколько моделей для объяснения кинетических закономерностей ферментативного липолиза (Brockerhoff, 1973, 1974; Verger et al., 1973; Wells, 1974; Slotboom et al., 1978). Benzonana, Degnuelle (1965) впервые показали, что необычные зависимости активности от концентрации субстрата, получающиеся в экспериментах с липолитическими ферментами, могут все же быть линеаризированы, если в качестве меры «концентрации» субстрата выбрать поверхность субстратной фазы, доступной для адсорбции фермента. Используя эмульсии субстратов, образуемые желчными солями в присутствии хлористого натрия, они установили, что активность пропорциональна общему объему эмульсии, а площадь межфазной поверхности может играть роль концентрации субстрата. Замена объемной концентрации субстрата площадью межфазной поверхности, хотя в некоторых случаях и оправдывает себя (Ory et al., 1967), в сущности не может быть применена для описания кинетики всех липолитических ферментов. Существуют данные, показывающие, что адсорбция липазы или фосфолипазы на поверхности раздела фаз, образуемой субстратом и водой, еще недостаточна для осуществления реакции (Dawson, Hemington, 1967; Okuda, Fujii, 1968; Op den Kamp et al., 1974). Кроме того, даже если адсорбция бывает продуктивной (т. е. сопровождается гидролизом субстрата), зачастую кинетические кривые имеют периоды индукции, в течение которых реакция не протекает вовсе или протекает с малой скоростью (Quarles, Dawson, 1969 b; Rosental, Shing-Hsien Han, 1971; Verger et al., 1973). Более того, в случае панкреатической липазы невозможно объяснить изменение механизма реакции при гидролизе длинноцепочечных триглицеридов, так же как и аномальное увеличение активности при комплексовании с колипазой (Semeriva, Desnuelle, 1976). Исследователи, работающие с различными липолитическими ферментами, обнаружили, что в составе молекул ферментов существуют особые группы — «контактные группы» (Papahadjoupoulos et al., 1973), «якорный центр» (Pieterson, 1973), «адсорбционно-комплектарный участок» (Рахимов и др., 1972), «центр узнавания» поверхности раздела липид — вода (Pieterson et al., 1974; и др.), которые ответственны за связывание фермента с поверхностными молекулами субстрата в липидной фазе и активацию фермента.

Модель для описания ориентации фермента на межфазной поверхности липид — вода и механизм его действия на примере панкреатической липазы были предложены Brockerhoff (1973). Согласно этой модели, липаза должна ориентироваться на поверхности раздела фаз таким образом, чтобы образовался комп-

лекс масло-энзим с участием гидрофобной «головки» фермента, которая в достаточной степени устойчива к разворачиванию. Межфазная ориентация липазы возможна в этом случае благодаря наличию положительно заряженного «основания» энзима и отрицательно заряженного углеводного «хвоста». Автор считает, что такие «головки», «основания» и «хвосты» должны быть присущи и другим липолитическим ферментам. Эта модель учитывала только то, что посадка фермента на поверхность должна быть специфичной, однако проявление специфичности связывалось исключительно с гидрофобным взаимодействием одного из аминокислотных остатков (например, лейцина) в молекуле панкреатической липазы с любой из гидрофобных групп липидного матрикса, локализованных на поверхности субстратной капли. Тем не менее, в опытах с фторчувствительной трибутириназой (Рахимов и др., 1972) показано, что у фермента имеется пространственно протяженный участок гидрофобной природы, который при адсорбции на поверхности субстрата образует локально ограниченную от водной среды полость, в которой в сущности и протекает энзиматический липолиз. Кроме того, предложенная модель только качественно описывала стадийность липолиза и не могла быть выражена количественно из-за неконкретности отдельных стадий ферментативной реакции. В частности, такая модель не объясняла периоды индукции при ферментативном гидролизе липидов и с какой стадией взаимодействия фермента и субстрата они связаны.

Verger et al. (1973), изучая кинетику гидролиза монослоев лецитина панкреатической фосфолипазой $A_2$, установили, что периоды индукции связаны с процессом проникновения фермента в монослой и последующим его активированием. Модель, предложенная авторами, предполагает обратимость адсорбции и исключает возможность денатурации фермента. Проникший в монослой энзим активируется ($E \rightarrow E^*$; где $E^*$ — активированный фермент, способный образовывать продуктивный комплекс Михаэлиса) и образует с субстратом «поверхностный» комплекс Михаэлиса. После каталитической стадии фосфолипаза высвобождается в форме $E^*$ с одновременным удалением продуктов реакции в водную фазу (имеется в виду гидролиз короткоцепочечных лецитинов, у которых продукты гидролиза водорастворимы) (Zografi et al., 1971).

Процесс «проникновения» отличается от неспецифической адсорбции, которая предшествует «проникновению». Равновесие $E \rightleftarrows E^*$, согласно этой модели, является лимитирующим процессом в осуществлении ферментативной реакции и характеризуется периодом индукции. Не исключено, что и процесс $E^* + S \rightleftarrows ES$ также может быть лимитирующим.

Определено, что индукционный период зависит от температуры, поверхностного натяжения в лецитиновых пленках, pH среды и концентрации ионов $Ca^{+2}$. Результаты, полученные при изучении влияния этих физических и химических факторов на индукционные

периоды реакции, указывают на возможность существования специального участка на ферменте (центра узнавания межфазной поверхности), пространственно отделенного от активного центра энзима и ответственного за процесс проникновения в монослой субстрата. Основным преимуществом рассматриваемой модели является то, что она может объяснить происхождение периода индукции и с ее помощью может быть создан математический аппарат для расчета константы проникновения, кажущейся константы Михаэлиса и времени проникновения (индукционный период).

Приведенный выше механизм активации панкреатической фосфолипазы $A_2$ не реализуется в случае исследования механизма поверхностной активации фосфолипазы $A_2$ из яда гремчей змеи (Wells, 1974). При этом реакция не лимитируется гидрофобным взаимодействием фермента с поверхностью раздела липид — вода, как отмечалось для фосфолипазы $A_2$ из панкреатической железы свиньи. Физическое состояние субстрата, тем не менее, в значительной степени определяет активность фосфолипазы из яда, которая также является функцией pH, ионной силы и присутствия ионов двухвалентных металлов. Более того, в работе Wells (1974) показано, что энтропия активации для ферментативного гидролиза короткоцепочечных лецитинов ниже для агрегированной формы субстрата, чем для мономерной. Это понижение энтропии активации при переходе от мономерной формы субстрата к агрегированной автор объясняет тем, что на поверхности раздела молекулы лецитина ориентированы благоприятным образом для продуктивного связывания с ферментом. Действительно, в большинстве случаев может оказаться, что естественная локализация субстрата на межфазной границе уже достаточна для такого связывания. Так, в случае большинства липаз гидролиз не сопровождается периодом индукции и достаточно гидрофобного взаимодействия молекулы фермента и субстратной фазы для активирования фермента (Garner, Smith, 1970; Джанбаева и др., 1972).

Фосфолипаза *D*, в отличие от других липолитических ферментов, в рассматриваемом аспекте практически не исследовалась. В качестве исключения можно отметить работу Quarles, Dawson (1969 b), посвященную гидролизу монослоев лецитина. Авторы определили, что некоторые особенности функционирования ферментов на границе раздела фаз присущи и фосфолипазе *D* при гидролизе нерастворимого субстрата. Например, активность этого фермента во многом зависит от величины поверхностного натяжения пленки. При исходном значении поверхностного натяжения 12—25 дин/см гидролиз осуществляется в 2 стадии: начальный, слабый гидролиз переходит в последующий быстрый. При значении ниже 3 дин/см и выше 28 дин/см не обнаружено ферментативного гидролиза монослоев чистого лецитина. Однако и при высоких значениях поверхностного натяжения (40 дин/см) может происходить интенсивный гидролиз, если в монослой, помимо ле-

цитина, внесена фосфатидиловая кислота в соотношении (1:1). При этом инициированию гидролиза фосфатидиловой кислотой способствовало добавление высоких концентраций ионов $Ca^{+2}$ и некоторых карбоксильных кислот в субфазу.

В свете этих результатов могут быть объяснены длительные периоды активации и автокаталитическое ускорение гидролиза в монослоях. Возможно, что гидролизуемая эфирная связь, соединяющая 2 заряженные группировки молекулы лецитина (фосфатную отрицательно заряженную и положительно заряженный остаток азотистого основания), находится непосредственно на поверхности раздела фаз и продукт реакции — фосфатидиловая кислота, оставаясь на поверхности раздела, выступает в качестве активатора реакции аналогично ДДС.

Основываясь на представленных выше данных, можно предположить, что образование продуктивного фермент-субстратного комплекса с единичной молекулой субстрата при гетерогенном ферментативном катализе в значительной степени зависит от стадий, предшествующих этому процессу. В частности, неправильная ориентация фермента или неподготовленность субстратной поверхности к соединению с ферментом могут привести к тому, что реакция не произойдет. Логично заключить, что ферменты, функционирующие в гетерогенных условиях, могут иметь «участки», ответственные за связывание с поверхностью. С другой стороны, поскольку липиды и фосфолипиды могут существенно менять свое фазовое состояние в зависимости от внешних условий и состава среды, то естественно предположить, что продуктивный липолиз будет протекать только в том случае, когда поверхность субстратной фазы «комплементарно» подогнана к таким участкам ферментов. Иными словами, поверхностный липидный слой с его динамической «архитектурой» может рассматриваться как тончайший регулятор каталитических процессов при гетерогенном ферментативном катализе. Поскольку такое специфическое взаимодействие должно сопровождаться образованием большого числа слабых связей как гидрофобного, так и ионного характера (в сущности, слипание двух поверхностей, имеющих группы, предопределенные к такому взаимодействию), то это должно значительно снижать энергию активации системы и повышать вероятность взаимодействия групп активного центра фермента и молекулы субстрата, непосредственно подвергающегося каталитическому превращению, по сравнению с реакцией, протекающей в гомогенных условиях. Поэтому можно ожидать, что ферментативные реакции в гетерогенных условиях должны отличаться высокими скоростями, что часто и наблюдается в реальных клеточных и субклеточных процессах.

Приведенные выше рассуждения подкреплены серией исследований (Рахимов и др., 1976а, д; 1977 а, 1978; Мадьяров, 1977). Необходимо отметить односторонний характер большинства работ, посвященных обсуждаемому вопросу. В основном исследова-

тели уделяют большое внимание роли липидной фазы: структуре липидного слоя, ее плотности, текучести, величине поверхности на межфазной границе липид — вода, ее кривизне, локализации и «геометрии» зарядов на этой поверхности, адсорбционным свойствам липидных образований, роли температурных фазовых переходов в липидных фазах, роли полярной «головки» и гидрофобных ацильных групп и др.

Подчеркивая важную роль указанных исследований и отмечая, что поставленная задача далека от окончательного решения, необходимо отметить, что имеются еще 2 аспекта, изучению которых в настоящее время почти не уделяется внимания. Это, во-первых, роль фермента в обеспечении комплементарности. В настоящее время совершенно не ясно, на каких уровнях организации белковой структуры обеспечивается формирование «участка узнавания»; нет ответа на вопрос, может ли фермент играть регуляторную роль при гетерогенном катализе, т. е. могут ли определенные конформационные переходы, наблюдающиеся при адсорбции фермента на межфазной границе, или какие-нибудь другие факторы, приводящие к изменению структурной организации или конформации фермента, определять скорость ферментативного процесса и специфичность реакции в гетерогенных условиях. Другой аспект — это роль интермедиатов, которые могут вступать во взаимодействие как с ферментом, так и с группами, локализованными в липидной фазе или одновременно и с тем и другими, модифицируя взаимодействующие поверхности, обеспечивать при этом необходимую комплементарность фермента и субстрата, т. е. высокую скорость и селективность гетерогенных ферментативных реакций. В качестве таких интермедиатов (не обязательно коферментов) могут выступать специальные соединения, например цитотоксины из ядов змей, ионы металлов (преимущественно ионы кальция), фосфолипиды и липиды, не являющиеся субстратами в исследуемой реакции, а в редких случаях и сами субстраты или субстратные образования.

Таким образом, можно выделить 3 задачи, решение которых приблизит нас к пониманию основных принципов гетерогенного ферментативного катализа и позволит обсуждать причины, определяющие необычайно высокую скорость и уникальную селективность, в первую очередь в отношении вида субстратов и гидролизуемых связей, реакций, ускоряемых ферментами на границе раздела фаз.

1. Выяснение роли физического состояния субстрата на межфазной границе в регуляции скоростей протекания и специфичности ферментативных реакций с нерастворимыми субстратами.

2. Выяснение влияния структурных особенностей биокатализатора и его состояния в растворе на специфичность взаимодействия фермент÷субстратная фаза.

3. Исследование каталитической и некаталитической роли интермедиатов.

В настоящей статье рассмотрены все 3 поставленные задачи. При решении первой задачи мы ограничились лишь фосфолипидными субстратами, преимущественно лецитином. В экспериментах с биологическими мембранами трактовка результатов не так конкретна в связи с возникновением новых сложных вопросов, в частности с наличием в биомембранах эндогенных фосфолипаз. При решении второй задачи мы выбрали объекты изучения, наиболее отчетливо выявляющие роль структурных факторов в регуляции специфичности и каталитической активности ферментов, а именно, ограничились исследованием фосфолипазы *D*, по мере необходимости привлекая данные с другими фосфолипазами. Наконец, при решении третьей задачи наши исследования посвящены в основном каталитическим и некаталитическим функциям ионов кальция, как наиболее распространенных интермедиатов реакций, катализируемых липазами и фосфолипазами.

Дальнейшее изложение проведено в порядке возрастания сложности системы: ламеллы в водно-органических средах, липосомы и мицеллы, слои фосфолипидов на поверхности твердой фазы, бислои фосфолипидов, мембранные системы, преимущественно полиферментные системы мембран митохондрий.

## РЕАКЦИИ В ВОДНО-ОРГАНИЧЕСКОЙ СРЕДЕ

Водорастворимые ферменты обычно дестабилизируются или ингибируются при их функционировании в водно-органических смесях (Tan, Lowien, 1972). Активирование фермента в водно-органической среде происходит очень редко. Фосфолипаза *D* является одним из примеров, когда активирование возможно в водно-органической среде. Показано, что диэтиловый эфир может повышать активность фосфолипазы *D* (Hanahan, 1952; Kates, 1953; Dawson et al., 1967; Jain, Cordes, 1973; Рахимов и др. 1976 а, в, г,). Имеются также сведения, что ацетон и метанол могут выступать в качестве активаторов этого фермента (Heller et al., 1968). В недавних работах (Рахимов, Мадьяров, 1977 а; Мадьяров, Рахимов, 1977), проведенных с целью выяснить природу активации фермента органическими растворителями, был исследован целый ряд органических соединений, различающихся физическими и химическими свойствами.

Не все испытанные органические растворители способны были активировать фосфолипазу *D*. Диэтиловый эфир, этилацетат, метилолеат, гексан, циклогексан, бензол, толуол, нитробензол и хлорбензол при добавлении в реакционную среду вызывают активацию. Растворители, смешивающиеся с водой, не приводят к активации фосфолипазы *D*. Органические растворители, не растворимые в воде (н-бутанол, бензиловый спирт, циклогексанол), тем не менее, не во всех случаях инициировали реакцию. Следовательно, образование гетерогенной системы — необходимое условие, но не достаточное. Для активирования фермента, по-видимому, важна не только локализация фермента и субстрата на гра-

нице раздела водной и органической фаз, но и определенная ориентация субстратных молекул на этой границе. Более подробное изучение активации фосфолипазы $D$ (на примере диэтилового эфира и этилацетата) показало, что активация действительно связана с фазовыми состояниями в гетерогенной системе. На рис. 1 *а, б* представлены зависимости удельной активности фосфолипазы $D$ от параметра

$$\lambda = (V_{орг}/V_{H_2O}) : (V_{орг}/V_{H_2O})_{макс},$$

где $V_{орг}$ — объем добавленного органического растворителя;

$V_{H_2O}$ — объем водного раствора, содержащего все необходимые для реакции компоненты;

$(V_{орг}/V_{H_2O})_{макс}$ — значение отношения указанных объемов, при котором наблюдается наибольшее активирующее действие.

При небольших значениях $\lambda$ происходит незначительная активация (рис. 1). При более высоких концентрациях органического растворителя активность значительно возрастает, достигая максимальной величины при $\lambda=1$. Точка пересечения касательных, проведенных для обоих участков, в случае диэтилового эфира соответствует $\lambda_0=0{,}68$ независимо от концентрации субстрата в реакционной системе. $\lambda_0$, в свою очередь, соответствует растворимости диэтилового эфира в воде при температуре опытов (4,8% при 30°). Активация в случае этилацетата происходит начиная с $\lambda_0=0{,}81$, что соответствует значению, совпадающему с растворимостью его в воде (5,8% при 30°). Участки кривых, заключенные между значениями $\lambda_0$ и $\lambda=1$, во всех случаях характеризуются тем, что в реакционной системе образуется устойчивое ламеллярное состояние и полученные результаты укладываются на прямую в координатах $1/A$ от $1/\lambda-\lambda_0$ (рис. 1 *в, г*).

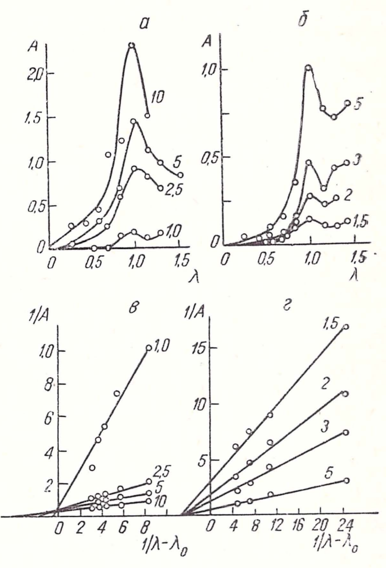



Рис. 1. Зависимость удельной активности фосфолипазы D от параметра $\lambda$ (*а, б*) и ее представление в координатах $1/A$ от $1/\lambda-\lambda_0$ (*в, г*).

*а, в* — диэтиловый эфир; *б, г* — этилацетат (цифрами указана концентрация лецитина в мМ).

Точки пересечения прямой с осью ординат позволяют определить величину $A_{макс}$ — скорость реакции при $\lambda-\lambda_0 \to \infty$, которая соответствует скорости ферментативной реакции при бесконечно

большом числе точек зарождения органической фазы с растворенным субстратом в водной дисперсии фосфолипида в случае, если бы ламеллярное состояние системы могло сохраняться при увеличении количества органического растворителя. Значение $A_{макс}$ при активации реакции диэтиловым эфиром не зависит от концентрации субстрата. Результаты, представленные на рис. 1 в, г, подчиняются уравнению:

$$\frac{1}{A} = \frac{1}{A_{макс}} + \frac{K_\lambda}{A_{макс}} \cdot \frac{1}{\lambda - \lambda_0}.$$

Из отрезков, отсекаемых на оси абсцисс, можно вычислить величину $K_\lambda$ — константы, которая не зависит от количества активатора, но является функцией объемной концентрации субстрата. Числовое значение константы $K_\lambda$ равно той величине $\lambda - \lambda_0$, при которой скорость реакции равна половине максимальной, т. е. является в определенной степени мерой того, насколько тот или иной активатор способен создавать ламеллярную систему. Чем меньше $K_\lambda$, тем лучшим активатором фосфолипазы является данный растворитель. В случае этилацетата $K_\lambda$ не зависит от концентрации субстрата, а значение $A_{макс}$ растет с увеличением количества лецитина в системе. Таким образом, активация фосфолипазы *D* органическими растворителями связана с образованием устойчивого ламеллярного состояния в реакционной среде.

Стабильность субстратной фазы, как упоминалось выше, является необходимым, но не достаточным условием для активации реакции. Значения активности во многом зависят от химической природы и физических свойств используемых для активации органических растворителей, а также от концентрации ионов двухвалентных металлов (Рахимов и др., 1976а, 1977а, 1978; Мадьяров, 1977). Это позволяет считать, что основными факторами, определяющими скорость ферментативного процесса в присутствии органических растворителей, являются ориентация групп полярной части субстратной молекулы, подвижность молекул субстрата и образование сложной системы зарядов на межфазной границе. Дополнительные подтверждения важности указанных факторов для ферментативного гидролиза фосфолипидов были получены при изучении промотирующего действия детергентов, адсорбентов и ультразвука.

## РЕАКЦИИ В МИЦЕЛЛЯРНЫХ СИСТЕМАХ

При изучении действия детергентов на ферментативную активность фосфолипазы *D* определено, что эффект активации связан не с простым диспергированием субстрата детергентами, при котором увеличивается площадь контакта фермента с субстратной фазой, а со специфической модификацией контактируемой поверхности раздела фаз (Рахимов и др., 1976 а, в; 1977а, 1978).

Наибольшей активирующей способностью обладает анионный детергент додецилсульфат натрия — ДДС. Другие детергенты — тритон X-100 (неионный детергент) и цетилтриметиламмоний бромистый (катионный детергент) слабо активировали ферментативный гидролиз лецитина, хотя при используемых концентрациях достигалась высокая степень дисперсности субстрата. В системе, содержащей лецитин, ионы $Ca^{+2}$ и ДДС, в этих условиях образуется устойчивая гетерогенная система, состоящая из водной фазы с растворенными ионами кальция и смешанных мицелл ДДС и лецитина. В такой системе состав неводной фазы зависит от количества добавленного ДДС, концентрации лецитина и от их молярного соотношения $\alpha=$[ДДС]/[S].

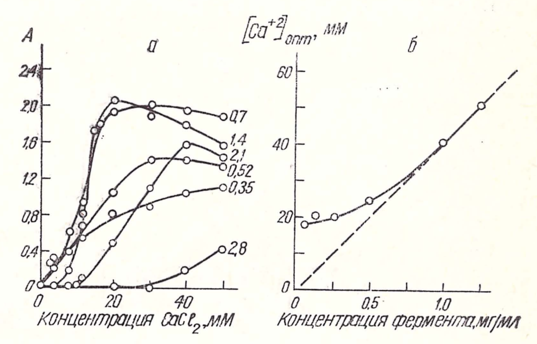



Рис. 2. Гидролиз смешанных мицелл лецитина и ДДС фосфолипазой *D*

*а* — зависимость удельной активности от концентрации $Ca^{2+}$ (цифрами указана концентрация ДДС в мМ), *б* — зависимость $[Ca^{2+}]_{опт.}$ от концентрации фермента.

На рис. 2, *а* представлена зависимость активности фосфолипазы *D* от концентрации $CaCl_2$ при различных концентрациях ДДС. Увеличение $\alpha$ введением возрастающих количеств ДДС приводит к повышению отрицательного заряда на поверхности смешанных мицелл субстрата и анионного детергента. При [S]=3 мМ повышение концентрации ДДС в составе смешанных мицелл до 1,4 мМ вызывает уменьшение оптимальной концентрации ионов кальция, необходимой для максимальной активности фосфолипазы *D*. Начиная с [ДДС]=0,7 мМ добавление определенного количества $CaCl_2$ не активирует фермент. На начальном участке кривой в этих случаях скорость реакции низка или равна нулю, несмотря на то, что в среде инкубации присутствуют ионы металла. Следовательно, повышение отрицательного заряда на поверхности субстратной фазы увеличением соотношения $\alpha$ требует непроизводительных затрат катионов $Ca^{+2}$. При этом количество $CaCl_2$, непосредственно обеспечивающее активацию фермента ($[Ca^{+2}]_{макс}$—$[Ca^{+2}]_0$), с ростом $\alpha$ уменьшается, достигая постоянного значения ~20 мМ (Рахимов и др., 1978). Роль ионов кальция в этом случае заключается в гашении избыточного отрицательного заряда (рис. 2, *а*).

Потребность в ионах кальция различна и в том случае, если изменять в реакционной среде концентрацию фермента, оставляя значения других параметров реакции постоянными: она увеличивается с ростом концентрации фермента (рис. 2, *б*).

Помимо этих результатов, можно привести данные, полученные в основном путем ингибиторного анализа с помощью ряда специфических ингибиторов, свидетельствующие о полифункциональности ионов кальция в исследуемой реакции.

**Ингибирование ионами лантана.** Ионы лантана являются эффективными ингибиторами данной реакции (рис. 3). Для полного ингибирования реакции, независимо от концентрации ионов кальция, достаточно всего лишь 4 мМ $La^{+3}$. Добавление лантана не изменяет характер зависимости скорости реакции от концентрации ионов кальция, снижается лишь значение максимально достигае-

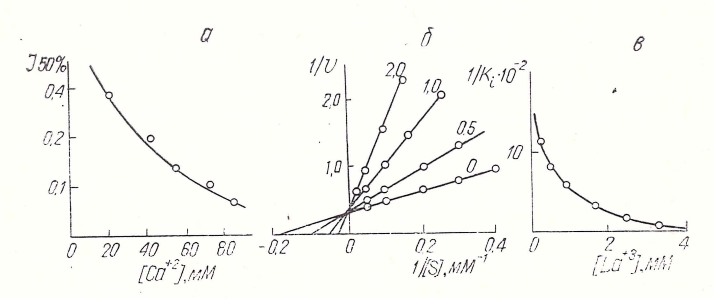



Рис. ?. Ингибирование фосфолипазы D лантаном.

*а* — влияние $[Ca^{2+}]$, *б* — зависимость $V$ от $[S]$ в координатах Лайнуивера и Берка (цифрами указана концентрация $[La^{+3}]$ в мм), *в* — зависимость $K_i$ от $[La^{+3}]$.

мой скорости реакции. Ингибирование ионами лантана тем эффективнее, чем выше концентрация ионов кальция в реакционной среде.

В координатах Лайнуивера—Берка, отрезки, отсекаемые на оси ординат ($1/K_{кат} \cdot E$) и оси абсцисс ($-1/K_м$), позволяют оценить величины $K_{кат}$ и $K_м$, которые в данном случае являются кажущимися константами. Если проводить измерения в присутствии переменных концентраций ионов лантана, то кривые пересекаются в точке на оси ординат, соответствующей $1/V_{max} = 8 \cdot 10^{-2}$. Из этого можно заключить, что присутствие ингибитора ($La^{+3}$) не влияет на каталитическую константу реакции. В то же время отрезки, отсекаемые на оси абсцисс, уменьшаются; это свидетельствует о том, что присутствие ингибитора тормозит процесс связывания биополимера и субстрата. С повышением концентрации $La^{+3}$ $K_м$ увеличивается.

Основываясь на изложенном, можно сделать вывод, что ионы лантана не влияют на протекание каталитической стадии реакции, препятствуя образованию промежуточного фермент-субстратного комплекса фосфолипазы *D* с единичной молекулой лецитина. При этом $K_i = 0{,}2$ мМ. Это означает, что лишь небольшая часть ионов кальция участвует в образовании комплекса Михаэлиса. Замена $Ca^{+2}$ в промежуточном фермент-субстратном комплексе на $La^{+3}$ делает фермент каталитически неактивным.

**Ингибирование ионами фтора.** Добавление $F^-$ в реакционную среду тормозит реакцию в исследуемой системе. Поскольку процесс торможения каталитической реакции является результатом взаимодействия ингибитора с некоторыми из компонентов, принимающих участие в катализе, возможны 3 причины, вызывающие торможение реакции ионами фтора: 1) образование нерастворимого $CaF_2$, в результате чего возникает дефицит в ионах кальция для образования промежуточного комплекса; 2) взаимодействие $F^-$ с функциональными группами активного центра фермента, что должно предотвратить либо связывание субстрата, либо его ка-

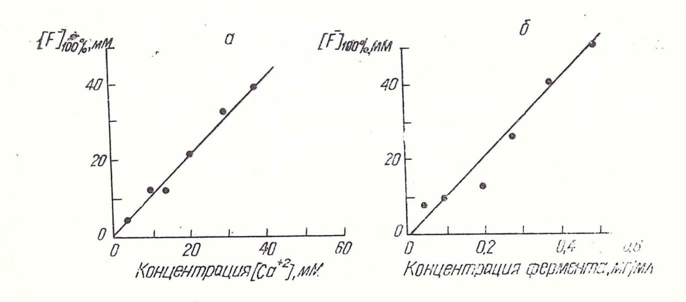



Рис. 4. Ингибирование фосфолипазы ионами фтора.

*а* — зависимость $[F^-]$, требуемой для полного ингибирования, от $[Ca^{+2}]$, *б* — то же, от [E].

талитическое превращение; 3) $F^-$ занимает одно из координационных мест в промежуточном комплексе с участием субстрата, фермента и ионов кальция.

При рассмотрении зависимости глубины ингибирования от концентрации ионов кальция было замечено, что возрастающие концентрации ионов металла снижают эффект ингибирования. Полное ингибирование наступает при эквимолярном соотношении ионов кальция и фтора, что однозначно исключает первую из перечисленных причин (рис. 4, а). Аналогичный эффект наблюдается и при изменении концентрации фермента: с увеличением концентрации фосфолипазы D в реакционной среде скорость ингибирования уменьшается (рис. 4, б). Это означает, что ионы $F^-$ ингибируют реакцию и в этом процессе принимают участие молекулы фермента. Концентрация ингибитора, вызывающая полную потерю каталитической активности, также коррелирует с изменением концентрации субстрата.

Из приведенных данных следует, что ингибирование, действительно, обусловлено тем, что ионы фтора внедряются в промежуточный комплекс, образующийся в реакции с участием $Ca^{+2}$, фосфолипазы *D* и смешанных мицелл субстрата. Внедрение от-

рицательного заряда ($F^-$) в состав комплекса делает невозможным протекание каталитической реакции в изучаемой системе.

**Ингибирование этилендиаминтетраацетатом натрия (ЭДТА).** ЭДТА специфически связывается с ионами кальция с образованием хелатного комплекса. Ингибирующий эффект ЭДТА на фосфолипазу *D* также можно было бы объяснить его хелатирующими свойствами. Действительно, при малых концентрациях ионов кальция в реакционной среде для такого ингибирования требуется эквимолярное количество ЭДТА (рис. 5). Однако с увеличением концентрации металла это соотношение нарушается, снижается

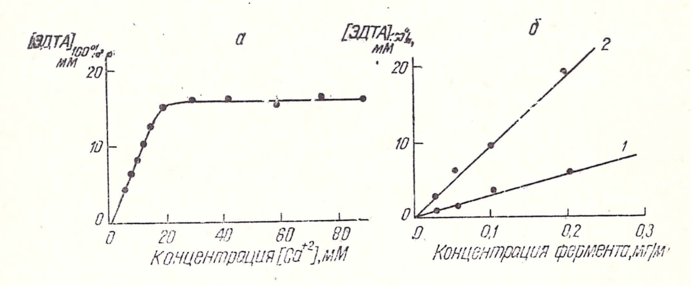



Рис. 5. Ингибирование фосфолипазы ЭДТА.

*а*—зависимость $ЭДТА_{100\%}$ от $[Ca^{2+}]$, *б*—то же от [E] при $[Ca^{2+}]$=5 мМ (*1*) и $Ca^{2+}$ =20 мМ (*2*).

скорость ингибирования, уменьшается концентрация ЭДТА, необходимая для 100% ингибирования (при 100 мм $Ca^{+2}$ расходуется лишь 16 мМ ЭДТА). Это, в свою очередь, исключает механизм ингибирования за счет хелатирующего действия ЭДТА по отношению к ионам кальция.

То, что эффект ЭДТА связан не с хелатированием кальция, а с определенным воздействием на промежуточный комплекс, подтверждает и другой экспериментальный факт: при исследовании зависимости ингибирования от концентрации фермента обнаружена прямая пропорциональная зависимость между концентрацией фосфолипазы и ЭДТА, вызывающим полное торможение реакции. Такая зависимость сохраняется для всех рассмотренных концентраций кальция, что свидетельствует о непосредственном связывании ЭДТА и фосфолипазы *D*.

**Активирующее действие магния на гидролиз лецитина.** Ионы магния не могут заменить $Ca^{+2}$ в исследуемой системе: даже при больших концентрациях $Mg^{+2}$ (до 100 мМ) реакция не протекает (Рахимов и др., 1976). Однако если вносить в реакционную среду $Mg^{+2}$ на фоне ионов $Ca^{+2}$, то он может повысить каталитический эффект (Календарева и др., 1978). Эти данные можно объяснить лишь предположением, что только небольшая часть ионов $Ca^{+2}$ принимает участие непосредственно в каталитической стадии реак-

ции в качестве двухвалентного катиона, создающего необходимую ионную силу. Ионы магния не способны заменить $Ca^{+2}$ в его каталитической роли, но заменяют его некаталитические функции, поэтому добавление $Mg^{+2}$ на фоне малых количеств $Ca^{+2}$ также повышает скорость реакции.

Суммируя приведенные выше данные, можно сделать вывод, что роль кальция неоднозначна. Кальций участвует в следующих реакциях:

1. Взаимодействие с ферментом: $Ca^{+2}+E \rightleftarrows Ca^{+2}\cdot E$.

О взаимодействии фосфолипазы *D* с ионами кальция свидетельствуют данные рис. 2, *б*, а также уменьшение интенсивности полосы поглощения в области 1600—1700 $см^{-1}$ ИК-спектров фосфолипазы *D* при добавлении ионов Са.

2. Связывание $Ca^{+2}$ с субстратом: $Ca^{+2}+S \rightleftarrows Ca^{+2}\cdot S$.

Способность ионов $Ca^{+2}$ образовывать соединения с лецитином и другими фосфолипидами доказана ЯМР и ИК-спектроскопически (Yabusaki et al., 1975; Календарева и др., 1978).

3. Образование комплекса со смешанными мицеллами:

$$Ca^{+2}+A+S \rightleftarrows \begin{matrix} Ca^{+2} - S \\ \diagdown \; \diagup \\ A \end{matrix} .$$

Образование тройного комплекса, включающего активатор и субстрат, видно на рис. 2, *а*. Избыток ДДС, равно как и избыток субстрата, приводит к уменьшению скорости реакции.

4. Образование смешанных комплексов $Ca^{+2}$ с ферментом, субстратом и детергентом: $Ca^{+2}+A+S+E \rightleftarrows$ (комплекс A, S, E, $Ca^{2+}$) .

Образование каталитически активных комплексов происходит именно по этой реакции. При отсутствии любого из компонентов, входящих в состав этого комплекса, каталитический процесс становится невозможным.

5. Нейтрализация избыточного отрицательного заряда на поверхности субстратных мицелл: увеличение концентрации ДДС в реакционой системе при S=const требует непроизводительных затрат кальция (рис. 2, *а*).

6. Определенная избыточная концентрация ионов $Ca^{+2}$ необходима для создания соответствующей ионной силы раствора непосредственно на границе раздела фаз. Эту функцию $Ca^{+2}$ могут выполнять и ионы $Mg^{+2}$.

Среди перечисленных видов взаимодействия только один — образование комплексов типа

$$\begin{array}{c} E \\ S \diagup\!\!\!\!\diagdown A \\ Ca^{2} \end{array}$$

— сопровождается каталитической реакцией.

Из приведенных выше экспериментальных данных нельзя сделать вывод об относительно точном составе и стехиометрии этого комплекса. Однако ясно, что эта стехиометрия достаточно точна и любая модификация такого комплекса сопровождается ингибированием процесса. Например, введение отрицательного заряда — избыток ДДС или присутствие ионов фтора:

$$\begin{array}{c} F^{\ominus} \\ S \quad E \\ Ca^{+2} - A \end{array}$$

или увеличение положительного заряда — замена двухвалентного $Ca^{+2}$ на трехвалентный ион $La^{+3}$:

$$\begin{array}{c} E \\ A \quad S \\ La^{+3} \end{array}$$

, модификация биополимера ЭДТА приводят к тому, что каталитический процесс становится невозможным.

В некаталитических стадиях наибольшие затраты ионов $Ca^{+2}$ связаны с созданием необходимой ионной силы непосредственно на границе раздела фаз. Этот процесс, по-видимому, достаточно сложен. Полученные нами результаты свидетельствуют, что именно ионы $Ca^{+2}$, способные модифицировать поверхность субстратной фазы, создают более строгую ориентацию компонентов на границе раздела фаз, более высокую степень упорядоченности системы. Исследования этого процесса в системах с органическими растворителями, на твердых сорбентах, при действии ультразвука и непосредственно на биологических мембранах (Рахимов и др., 1978) показали, что чем в более организованном состоянии находится субстрат, тем меньше необходимо ионов $Ca^{+2}$ для инициирования реакции.

Обычная схема гидролитического действия фосфолипазы *D* может быть описана как:

$$E + S \underset{K_{-1}}{\overset{K_1}{\rightleftarrows}} (ES) \xrightarrow[\downarrow \text{холин}]{K_2} PhE \xrightarrow[+H_2O]{K_3} E + PhOH + H^+, \qquad (1)$$

где PhE — фосфатидилфермент,
PhOH — фосфатидиловая кислота,
$K_1$, $K_{-1}$, $K_2$, $K_3$ — константы скоростей соответствующих стадий реакций.

В этой схеме реакции, однако, совершенно не учтена роль ионов кальция и субстратной фазы, состояние которой важно для протекания каталитической реакции. С другой стороны, данная схема предполагает, что в активном центре фермента имеется только 2 участка: связывающий, ответственный за образование фермент-субстратного комплекса $\left(K_s = \frac{K_{-1} + K_2}{K_1}\right)$, и каталитический, непосредственно ускоряющий процесс гидролиза ($K_3$).

Недавно было показано, что у ферментов, катализирующих реакции с нерастворимыми субстратами, в частности у липолитических ферментов, имеется участок, ответственный за «узнавание» субстратной фазы. Только при наличии комплементарности между участком узнавания и поверхностью субстратной фазы возможна специфическая адсорбция фермента на межфазной границе и последующая перестройка адсорбционного комплекса в комплекс Михаэлиса.

Выше отмечалось, что лецитин и молекулы анионного детергента образуют в воде смешанные мицеллы и в связывании с фосфолипазой *D* может участвовать лишь часть молекул субстрата, именно та, которая локализована на границе раздела фаз липид-вода. Большая часть молекул находится в объеме липидной фазы и не принимает участия в ферментативном процессе. При изменении объемной концентрации субстрата $S_V$ его поверхностная концентрация $S_\Omega$ меняется не пропорционально, так как при этом меняются размеры и форма мицелл. Величину поверхности раздела фаз вода-фосфолипид можно варьировать путем изменения концентрации лецитина в системе.

Реакция не может протекать с мономерным субстратом. Необходимо наличие элементарной площадки на границе раздела фаз, состоящей как минимум из 5 молекул лецитина и 1 молекулы ДДС (имеется в виду стихиометрия — размер площадки определяется размерами фосфолипазы *D*), т. е. роль субстрата в данном случае вместо единичной молекулы выполняет некоторый «ансамбль» из молекул лецитина и ДДС. Из этого следует, что уравнение (1) необходимо представить следующим образом:

$$E + S_\Omega \cdot S_V \underset{K_{-a}}{\overset{K_a}{\rightleftharpoons}} (ES_\Omega) \cdot S_V \underset{K_{-1}}{\overset{K_1}{\rightleftharpoons}} (E^*S')_m \cdot S_V \cdot S_\Omega \xrightarrow[\downarrow\ \text{холин}]{K_2} (PhE) \cdot$$

$$\cdot S_\Omega \cdot S_V \xrightarrow[+H_2O]{K_3} (E^* \cdot S_\Omega) \cdot S_V + PhOH, \qquad (1')$$

где $E$ — фермент;

$S_\Omega \cdot S_V$ — субстрат (такое обозначение применено, чтобы разграничить молекулы субстрата, локализованные на границе раздела фаз $S_\Omega$, т. е. доступных для связывания с ферментом, и $S_V$ — молекулы субстрата, локализованные в объеме субстрат-

ной фазы, которые не могут непосредственно взаимодействовать с ферментом);

$E^*$ — активированная форма фермента, означающая, что образованию комплекса Михаэлиса предшествует стадия адсорбции и конформационной перестройки фермента;

$S'$ — единичная молекула субстрата, которая экстрагируется в глобулу фермента и подвергается энзиматическому расщеплению;

$(E^*S')$ — комплекс Михаэлиса, образованный в локально ограниченной полости, создаваемой поверхностью смешанных мицелл и „участком узнавания" фермента;

Ph — фосфатидил;

$K_a$ и $K_{-a}$ — константы адсорбции и десорбции фермента на поверхности субстратной фазы.

При этом не обязательно, чтобы происходила десорбция фермента после каждого элементарного цикла реакции (рис. 6). Естественно, что стадии, предшествующие образованию комплекса Михаэлиса, должны влиять на общую кинетику процесса. При этом можно считать, что наряду с основной реакцией могут происходить реакции: $E + Ca^{+2} \rightleftarrows Ca^{+2} \cdot E$

$$S + A + Ca^{+2} \rightleftharpoons [S_m - A_n, Ca_x^{+2}] \overset{E}{\rightleftharpoons} [E^*; S_m, A_n, Ca_x^{+2}]_{\alpha=\alpha_0} \rightleftharpoons$$

$$[ES; S_m, A_n, Ca_x^{+2}]_{\alpha\neq\alpha_0} \xrightarrow{\text{ХОЛИН}} [PhE; S_{m-1}, A_n, Ca_x^{+2}]_{\alpha\neq\alpha_0} \overset{H_2O}{\rightleftharpoons} [E^*; S_{m-1}, A_n, Ca_x^{+2}]_{\alpha\neq\alpha_0} + PhOH + H^+ \qquad (2)$$

$$[E^*; S_m, A_n, Ca_x^{+2}] \underset{-S}{\overset{+S}{\rightleftharpoons}} [E^*; S_{m+1}, A_n, Ca_x^{+2}] \qquad (3)$$

$$[E^*; S_m, A_n, Ca_x^{+2}] \underset{-A}{\overset{+A}{\rightleftharpoons}} [E^*; S_m, A_{n+1}, Ca_x^{+2}] \qquad (4)$$

где под $S_{m+1}$ и $A_{n+1}$ обозначены избыточные молекулы субстрата и активатора относительно стехиометрического соотношения.

Эти уравнения означают, что в присутствии ионов кальция избыток субстрата ($\alpha<0{,}2$) или избыток ДДС ($\alpha>0{,}2$) приводят к ингибированию основной реакции независимо от их абсолютной

концентрации. При этом часть фермента не может принимать участия в реакции из-за образования неактивных комплексов (уравнения 3, 4).

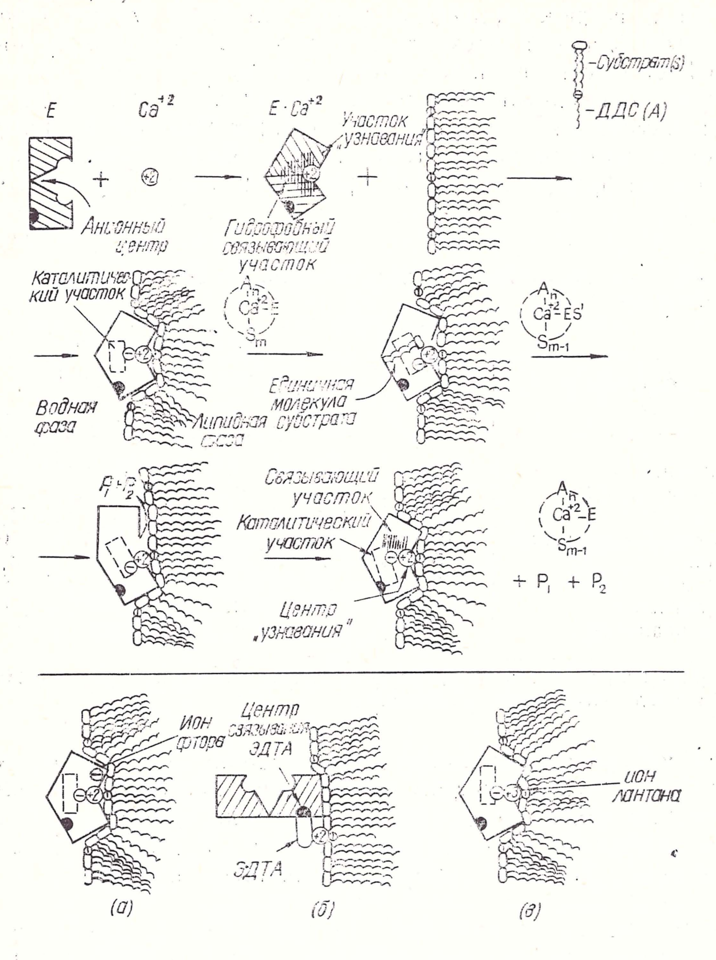



Рис. 6. Схематическое представление механизма действия фосфолипазы *D* на границе раздела фаз и влияние ионов фтора (*а*), ЭДТА (*б*) и ионов лантана (*в*).

## РЕАКЦИИ НА ПОВЕРХНОСТИ ТВЕРДОЙ ФАЗЫ

Активированное состояние фермента создается на хорошо развитой границе раздела фаз, однако существуют, по-видимому, некоторые ограничения свойств этой межфазной границы. Можно предполагать, что межфазная поверхность нужна для иммобилизации фермента, следствием чего является изменение конформа-

ции фосфолипазы *D* и переход ее в активированное состояние. Действительно, активация фермента наблюдается и на поверхности твердой фазы. На поверхности силикагеля, силохромов, бентонита и гидроксилапатита фосфолипаза *D* может осуществлять катализ даже в отсутствии ионов кальция, а при добавлении $CaCl_2$ скорость увеличивается (табл. 2).

На рис. 7 представлены результаты более детального исследования активации ферментативного процесса на границе раздела фаз вода-силикагель. Как следует из рисунка, увеличение концентрации фосфолипазы *D* требует в этом случае большей

Таблица 2

**Влияние $CaCl_2$ на активацию фосфолипазы D некоторыми адсорбентами**

| Адсорбент | Количество адсорбента, мг | Удельная активность pH 5,6 а | pH 5,6 б | pH 7,2 а | pH 7,2 б |
|---|---|---|---|---|---|
| Силикагель | 50 | 1,1 | 4,1 | 0,7 | 3,1 |
| Силохром СХ-1,5 | 200 | 0,2 | 1,0 | — | — |
| Силохром СХ-3 | 200 | 0,2 | 1,0 | 0,4 | 1,1 |
| Активированный уголь | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Бентонит | 50 | 0,3 | 1,1 | 0,2 | 0,7 |
| ДЭАЭ-целлюлоза | 50 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| КМ-целлюлоза | 50 | 0 | 0,3 | 0 | 0 |
| Гидроксилапатит | 50 | 0,7 | 0,7 | 0,4 | 1,2 |

Примечание. а—в отсутствии $CaCl_2$, б—в присутствии 20 м*М* $CaCl_2$ в среде измерения активности.

площади межфазной границы для ее адсорбции, причем эффективность адсорбции, сопровождающейся активацией фермента, выше из разбавленных растворов. С увеличением концентрации субстрата скорость реакции повышается и для достижения ее максимального значения требуется меньшее количество силикагеля.

Результаты, представленные на рис. 7 *а*, получены в условиях, когда активация была выявлена при добавлении к навеске силикагеля заранее приготовленной субстратной смеси [система 1 — $(S+E)+SiO_2$]. В этом случае нельзя установить, какой из возможных 3 случаев реализуется: 1) на силикагеле адсорбируется фермент, в результате чего он становится способным образовывать с субстратом продуктивный комплекс, в этом случае активация фермента должна полностью определяться его адсорбцией на силикагеле; 2) на поверхности силикагеля адсорбируется субстрат и активация определяется тем, что фермент-субстратные взаимодействия происходят с ориентированными на поверхности адсорбента молекулами субстрата, аналогично описанной в литературе активации ферментов на монослоях леци-

тина (Полторак, Чухрай, 1970); 3) активация является результатом адсорбции неактивных комплексов типа фермент-субстрат, которые могут распадаться с образованием продуктов реакции лишь в адсорбированном состоянии.

С целью выбора наиболее правильного варианта проведены следующие эксперименты. К навеске силикагеля добавляли переменные количества суспендированного лецитина. После 30-минутной инкубации при перемешивании в систему добавляли фермент. Результаты измерения активности в такой системе [система 2—(S+$SiO_2$)+E] приведены на рис. 7, *б*. Видно, что активация фермента происходит и в этом случае. Абсолютные значения активности в системе 2 вдвое выше значений активации в системе 1. Более того, если в системе 1 активация при увеличении количества силикагеля резко снижается после достижения определенного максимума, то в системе 2 удельная активность возрастает до некоторого предела и существенно не изменяется при дальнейшем увеличении количества силикагеля. Эти различия более четко проявляются при работе с низкими концентрациями фермента и высокими концентрациями субстрата.

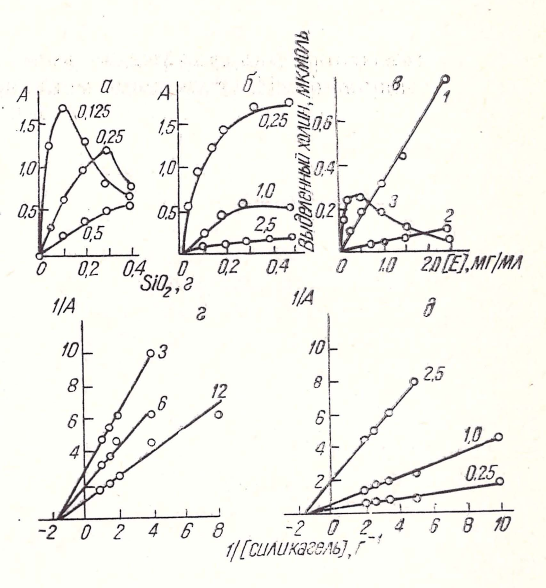



Рис. 7. Активация фосфолипазы *D* силикагелем.

*а*—(E+S)+$SiO_2$; *б*—(*S*+$SiO_2$)+E (E указаны цифрами), *в*—(E+$SiO_2$)+S; *1*—до адсорбции, *2*—в растворе после адсорбции, *3*—иммобилизованный фермент; *г*, *д*—зависимости 1/A от 1 (силикагель) при различных концентрациях лецитина и фосфолипазы *D* (указаны цифрами) соответственно.

На рис. 7, *в* приведены данные, полученные в результате предварительной адсорбции фермента на силикагеле [система 3—(E+$SiO_2$)+S]. Раствор фермента добавляли к навеске силикагеля, инкубировали 15 мин при 30°C и центрифугировали. В надосадочной жидкости определяли количество неадсорбированного фермента, измеряя его активность. Как и в системах 1 и 2, в системе 3 наблюдается активация фосфолипазы *D* силикагелем. Однако значение максимальной активности в этом случае намного ниже, чем в указанных системах.

Активность значительно снижается при увеличении концентрации фермента. По-видимому, молекулы фермента способны акти-

вироваться только при малых степенях заполнения поверхности силикагеля, а снижение активности связано с взаимодействием молекул фермента на поверхности (Полторак, Чухрай, 1971). Действительно, при низких концентрациях фосфолипазы *D* активация, обусловленная адсорбцией на силикагеле, в 2—3 раза превышает активацию на границе раздела фаз диэтиловый эфир — вода.

Описанные выше опыты отличались тем, что локализация фермента и субстрата на границе раздела силикагель—вода была осуществлена различными способами. В системе 1 на поверхности силикагеля подвергались адсорбции ассоциаты фермента с субстратом. В системе 2 происходило связывание фермента с субстратом на модифицированной лецитином поверхности твердой фазы. И, наконец, в системе 3 удалось проследить активацию адсорбционно-иммобилизованной фосфолипазы *D*.

Из представленных результатов можно сделать вывод, что активация фосфолипазы *D* происходит незавсимо от того, каким способом локализованы фермент и субстрат на границе раздела фаз, хотя величина активности и характер активации в каждом конкретном случае различны. Если к адсорбированному на силикагеле субстрату добавляют фермент (система 2), полученные результаты укладываются в прямую линию в координатах 1/А от 1/ [а] (рис. 1, *г, д*), где [а] — концентрация адсорбента. Константа $K_a$, определенная по точке пересечения прямых с осью абсцисс, не зависит от концентрации фермента и субстрата. Это означает, что на поверхности силикагеля имеется строго определенное количество центров, на которых возможна адсорбция фермента и субстрата, приводящая к активации фосфолипазы *D*. Совпадение констант $K_a$, вычисленных из рис. 7, *г, д*, свидетельствует, что центры для адсорбции фермента и субстрата являются одними и теми же. Константа $K_a$ аналогично константе $K_\lambda$ характеризует активирующую способность силикагеля при гидролизе фосфолипидов на границе раздела фаз в присутствии фосфолипазы *D*.

Таким образом, можно констатировать, что активация фосфолипазы *D* возможна не только на границе раздела жидкость—жидкость (вода — органический растворитель), но и на границе раздела жидкость — твердое тело (вода — силикагель). Однако и в этом случае не всякая твердая поверхность способна вызывать активацию фермента. Так, в системе вода — активированный уголь адсорбция фермента или субстрата на поверхности твердой фазы не приводит к активации фосфолипазы *D* (табл. 2, рис. 8). По-видимому, сильное гидрофобное связывание с поверхностью угля делает невозможным образование продуктивных фермент-субстратных комплексов. Более того, добавление активированного угля в систему, в которой фосфолипазу *D* активировали диэтиловым эфиром или ДДС, снижает скорость реакции (рис. 8). Этот факт означает, что адсорбция фосфолипазы *D* на твердой поверхности предпочтительней ее адсорбции на слоях лецитина,

локализованного на границе раздела фаз двух несмешивающихся жидкостей или мицелл, образованных субстратом и ДДС. Это подтверждается и тем, что при замене активированного угля силикагелем в аналогичных опытах также наблюдается уменьшение скорости реакции, инициированной диэтиловым эфиром или ДДС, но при увеличении количества силикагеля скорость реакции вновь растет из-за активации фермента, обусловленной силикагелем.

Таким образом, исследования с органическими растворителями и силикагелем показывают, что кинетические эффекты в таких системах полностью связаны с адсорбцией фосфолипазы D на межфазной поверхности и приводят к выводу, что каталитическая активность фермента целиком определяется его адсорбционной иммобилизацией. Действительно, на поверхности силикагеля, силохромов, бентонита и гидроксилапатита фосфолипаза D может осуществлять катализ даже в отсутствии ионов кальция (табл. 2); при добавлении $CaCl_2$ скорость реакции увеличивается. Это, по-видимому, объясняется тем, что ионы кальция создают упорядоченные структуры на границе раздела фаз в системе субстрат-активатор-водный раствор (Jacobson, Papahadjopoulos, 1975; Yabusaki, Wells, 1975), способствуя лучшей адсорбции фосфолипазы D. В пользу этого свидетельствует и тот факт, что мицеллы лецитина, обработанные ультразвуком, могут подвергаться гидролизу под действием фосфолипазы D и в отсутствии активаторов; достаточно присутствия ионов $Ca^{+2}$ (Dawson, Hemington, 1967).

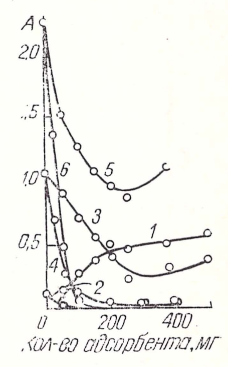



Рис. 8. Влияние силикагеля и активированного угля на фосфолипазу *D*.

*1* — силикагель, *2* — активированный уголь, *3* — силикагель с диэтиловым эфиром, *4* — активированный уголь с диэтиловым эфиром, *5* — силикагель с ДДС, *6* — активированный уголь с ДДС.

Представленные выше результаты показывают, что водорастворимая фосфолипаза D может активироваться соединениями, значительно различающимися по физико-химическим свойствам. Это позволяет понять, почему основные характеристики фосфолипазы *D*, изученные в опытах in vitro, противоречивы и зависят в значительной степени от вида применяемого активатора. Можно предполагать, что в экспериментах с различными активаторами физическое состояние поверхности раздела фаз, содержащей субстрат, и распределение функциональных групп на поверхности неодинаковы. Поэтому, естественно, каталитическая активность фосфолипазы *D* проявляется лишь в тех случаях, когда состояние поверхности субстратных образований «сконструировано» определенным образом. Так, предпочтительнее активация фермента на монослоях лецитина, адсорбированного на силикагеле (рис. 7, *б*), а монослой из молекул лецитина, ориентированных противоположным образом (на поверхности активированного угля — рис. 8, табл. 2), неспособны придать фосфолипазе активную конформацию.

Активация наблюдается на лецитиновых слоях, локализованных на границе раздела фаз, образованных несмешивающимися с водой жидкостями (рис. 1), но невозможно протекание реакции в аналогичных условиях в гетерогенных системах, образованных водой и нерастворимыми спиртами (помимо октанола). Некоторые низшие спирты, например н-бутанол, хотя и образуют несмешивающиеся с водой системы, неспособны быть активаторами фермента. Гидролиз лецитина не происходит на поверхности ДЭАЭ-целлюлозы, ДЭАЭ-сефадекса А-50, КМ-сефадекса С-50, твердого додецилсульфата кальция и окиси алюминия, а на цеолитах реакция протекает со скоростью несколько меньшей, чем с силикагелем. Для цеолита NaA удельная активность составляет 0,47 ед/мг, для цеолита CaA — 0,27, NaX — 0,29, CaX — 0,59. В некоторых случаях наблюдается несколько экстремумов активности (Рахимов, Мадьяров, 1977), соответствующих нескольким фазовым состояниям в системе: органический растворитель — лецитин — водный раствор.

Таким образом, каталитически активное состояние фосфолипазы следует рассматривать как адсорбционно-иммобилизованное. Можно считать, что водорастворимая фосфолипаза *D* является, скорее всего, артефактом выделения, а в условиях in vivo она связана с мембранами клеточных частиц и функционирует в адсорбированном состоянии. Об этом косвенно свидетельствует и то, что в некоторых исследованиях, в которых авторы изучали неочищенную фосфолипазу *D*, удавалось провести гидролиз в присутствии двухвалентных катионов без каких-либо активаторов, а также то, что, варьируя условия экстракции, можно было получить фосфолипазу *D* как в растворимой, так и в нерастворимой форме (Talwalkar et al., 1969). Изучая динамику активации фосфолипазы *D* при разрушении мембранных структур, Roughan, Slack (1976) пришли к выводу, что фосфолипаза *D* представляет собой структурный белок и не является ферментом, а ее каталитическая активность возникает лишь при нарушении структуры мембран. Это согласуется с утверждением, что фосфолипазу *D* следует рассматривать в роли своеобразного «санитара» мембранных систем (Dharmalingam, Jayaraman, 1972).

Несмотря на то, что водорастворимая фосфолипаза *D* не обладает каталитической активностью, изучение ее активации в различных условиях может дать ценную информацию о ферментативных процессах, протекающих на границе раздела фаз, и некоторых закономерностях гетерогенного ферментативного катализа. Не исключено, что число ферментов, которые теряют или изменяют свои каталитические свойства при переходе из мембранной фазы в водную, не ограничивается фосфолипазой *D*.

## ДЕЙСТВИЕ ФОСФОЛИПАЗ НА МЕМБРАННЫЕ СТРУКТУРЫ. РОЛЬ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ

Химические соединения, используемые для инициирования ферментативной реакции, модифицируя поверхность субстратной фазы, могут также влиять на каталитическую активность фосфолипазы и активирующее действие ионов кальция и тем самым искажать результаты. В связи с этим изучено действие фосфолипазы *D* на мембраны обработанных ультразвуком липосом, искусственные бислойные фосфолипидные мембраны (БФМ), мембраны митохондрий и микросом, не требующие присутствия в реакционной среде инициаторов химической природы (Рахимов и др., 1978).

Как следует из предыдущих разделов, водные дисперсии лецитина, не подвергавшиеся действию ультразвука, не расщепляются фосфолипазой *D* даже в присутствии ионов кальция. Обработка субстрата ультразвуком изменяет свойства бимолекулярного слоя липосом, модифицируя их размеры и кривизну поверхности, и тем самым делает возможным ферментативный гидролиз на их поверхности. В отсутствие $Ca^{+2}$ гидролиз фосфолипидов липосом не наблюдался, а при добавлении ионов кальция их оптимальная концентрация зависит от времени обработки липосом ультразвуком. Для липосом, облученных в течение 5 мин, опимальная концентрация ионов $Ca^{+2}$ составляет 4—14 м*M*, в то время как после 10-минутной обработки ультразвуком фосфолипиды липосом расщеплялись фосфолипазой *D* с максимальной скоростью при 20—30 м*M* $CaCl_2$. При исследовании влияния ионов кальция при различных концентрациях субстрата на скорость гидролиза озвученного лецитина фосфолипазой *D* были определены параметры этого процесса: максимальная скорость $A_{макс} = 0{,}45 \frac{\text{мкмолей холина}}{\text{мин}\cdot\text{мг}}$ и константа активации $K_a = 9{,}9$ м*M*, характеризующая активирующую способность $Ca^{+2}$.

В случае действия фосфолипазы *D* на БФМ стимулирующий эффект ионов кальция также проявляется и зависит от pH среды. Если время разрыва БФМ ($\tau_р$) в отсутствие $Ca^{+2}$ равно 90 мин, то время, необходимое для разрыва бислоя, значительно сокращается при введении ионов кальция в субфазу. Например, 10 м*M* $CaCl_2$ снижает $\tau_р$ до 12 мин при pH 5,6 и до 40 мин при pH 7,0, а 20 м*M* $CaCl_2$ — до 2 и 20 мин, соответственно. Таким образом, фосфолипаза *D* активируется ионами кальция и при действии на фосфолипиды, упорядоченные в бислойные мембраны.

Несколько иные результаты получены при изучении действия фосфолипазы *D* на фосфолипиды биологических мембран. Изменение активности некоторых мембранных ферментов митохондрий и микросом является чувствительным тестом для обнаружения действия фосфолипаз на фосфолипиды этих органелл. В работах Рахимова и др. (1977 в, 1978) показаны изменения активностей

НАД. Н-оксидазы, сукцинатоксидазы и цитохром с-оксидазы при действии фосфолипазы *D* на митохондрии. НАД.Н-оксидаза и сукцинатоксидаза инактивируются под действием фермента и в отсутствие ионов $Ca^{+2}$, в то время как цитохром с-оксидаза в этих условиях не подвержена действию фосфолипазы *D*. Добавление в систему инкубации только 2 м*М* $CaCl_2$ значительно повышает скорость инактивации всех трех ферментных систем. Дальнейшее повышение концентрации ионов $Ca^{+2}$ (5 м*М*, 10 м*М* и т. д.) незначительно изменяет скорость инактивации в изучаемых системах, но одновременно с ростом концентрации кальция происходит стабилизация инактивирующего действия фосфолипазы *D* (особенно при времени инкубации больше 1 ч).

При действии фосфолипазы *D* на АТФазную систему микросом мозга обнаружено, что расщепление фосфолипидов этих органелл происходит и в отсутствие ионов $Ca^{+2}$ (Рахимов и др., 1978). Это действие сопровождается уменьшением (30%) активности $Mg^{+2}$ АТФазы и увеличением активности $Na^{+}$, $K^{+}$-АТФазы в 1,3 раза. Причина увеличения активности этого фермента при гидролизе фосфолипидов микросом заключается в том, что фосфолипаза *D* не способна расщеплять фосфатидилсерин, необходимый для функционирования $Na^{+}$, $K^{+}$-АТФазы (Burstein et al., 1971). В присутствии 1 м*М* $CaCl_2$ эффективность действия фосфолипазы *D* на АТФазную систему уменьшается, а добавление 10 м*М* $CaCl_2$ полностью снимает эффект этого фермента. В этом случае ионы кальция выступают как ингибиторы фосфолипазы *D*. Данные о действии фосфолипаз других типов на мембранные АТФазы приведены в статье Н. М. Мирсалиховой данного сборника.

Таким образом, эффекты, получаемые при действии фосфолипаз на мембранные системы, в значительной степени зависят от вида мембран и тестируемых активностей полиферментных систем. В связи с этим в дальнейшем изложении мы ограничились лишь мембранами митохондрий и исследовали действие фосфолипаз различного происхождения (фосфолипаза $A_2$ яда кобры и фосфолипаза *D*) на полиферментные системы дыхательной цепи митохондрий. При введении очищенной фосфолипазы $A_2$ яда кобры непосредственно в полярографическую ячейку снижается скорость потребления кислорода интактными митохондриями при окислении субстратов. Величина эффекта зависит от концентрации фермента и не зависит от вида субстрата (сукцинат, $\alpha$-кетоглутарат).

С повышением количества фосфолипазы $A_2$ до 1,6—2,0 мкг/мг белка митохондрий скорость окисления сукцината снижается. Более высокие концентрации фермента, напротив, повышают скорость окисления сукцината кислородом. В то же время скорость окисления в присутствии АДФ и после его исчерпания продолжает уменьшаться при тех же концентрациях фермента, что свидетельствует о снижении дыхательного контроля и отношения ADP/O, которое выше концентрации 1,6 мкг/мг белка митохондрий практически равно нулю. Следовательно, при действии на

интактные митохондрии фосфолипазы $A_2$ происходит разобщение окислительного фосфорилирования и ингибирование процесса переноса электронов по дыхательной цепи.

Если осуществлять предварительную инкубацию митохондрий с ферментом при 2°С, можно наблюдать кинетику разобщающего действия фосфолипазы из яда кобры. Уже при концентрации 0,004 мкг/мг белка скорость окисления сукцината в начальный период растет из-за разобщения дыхания и фосфорилирования (значения ДК и ADP/O уменьшаются), а затем скорость окисления снижается по сравнению с максимальной. При повышении температуры инкубации (20°С вместо 2°С) все эффекты ускоряются. Полученные данные свидетельствуют, что в результате каталитического действия фосфолипазы $A_2$ на гидролиз фосфолипидов в мембранах митохондрий протекают процессы разобщения окислительного фосфорилирования и ингибирование переноса электронов по сукцинатоксидазной системе. Эти заключения в целом согласуются с выводами существующих публикаций по действию фосфолипаз на интактные митохондрии (Кхолэ и др., 1980).

Инкубирование с фосфолипазой $A_2$ полностью разобщенных митохондрий также приводит к уменьшению активности сукцинатоксидазы и ротенончувствительной НАД. Н-оксидазы (дыхательная цепь). Чем выше концентрация фермента, тем быстрее подавляется активность этих ферментных систем, а в аналогичных условиях измерения повышается активность ротенокнечувствительной НАД. Н-оксидазы (через цитохром $в_5$) и цитохром с-оксидазы. На рис. 9 показаны изменения сукцинат- и НАД. Н-оксидазной активностей митохондрий под действием фосфолипазы *D* в отсутствие ионов кальция. С повышением дозы фосфолипазы *D* сукцинатоксидазная активность снижается, что свидетельствует в пользу того, что фосфолипаза способна функционировать и в отсутствие добавленных извне ионов кальция.

Возможно, для активации достаточно присутствия эндогенных ионов кальция, локальная концентрация которых на границе раздела фаз может отличаться от средней концентрации. НАД. Н-оксидаза в присутствии тех же количеств фосфолипазы *D* несколько активируется, но с увеличением времени инкубации (от 30 до 60 мин) или концентрации фермента эта активация исчезает. Фосфолипаза *D* вызывает инактивацию и в случае сукцинатоксидазы. В присутствии 50 мМ $CaCl_2$ в среде инкубации эффект фосфолипазы *D* изменяется, причем сукцинатоксидаза инактивируется ферментом с меньшей скоростью. Увеличение концентрации фосфолипазы *D* практически не приводит к возрастанию инактивирующего эффекта.

Прежде чем представить данные о совместном влиянии $Ca^{+2}$ и фосфолипазы *D*, приведем результаты по ионам $Ca^{+2}$. Низкие концентрации $Ca^{+2}$ (до 0,6 мМ) влияют на активность указанных полиферментных систем (рис. 10). Увеличение концентрации $Ca^{+2}$ до 8 мМ приводит к повышению активности НАД. Н-оксидазы и

снижению активности сукцинатоксидазы. Если увеличить концентрацию $Ca^{+2}$ до 60 мМ, происходит общее подавление активности указанных полиферментных систем. Ионы $Ca^{+2}$ улучшают включение цитохрома **с** в мембраны митохондрий при невысоких концентрациях, высокие же концентрации ионов кальция препятствуют связыванию цитохрома **с** с мембранами (за меру включения цитохрома **с** принимается прирост НАД·Н — или сукцинатоксидазной активности). Если оценивать включение цитохрома **с** по изменению НАД·Н-оксидазной активности, $Ca^{+2}$ в широком диапазоне

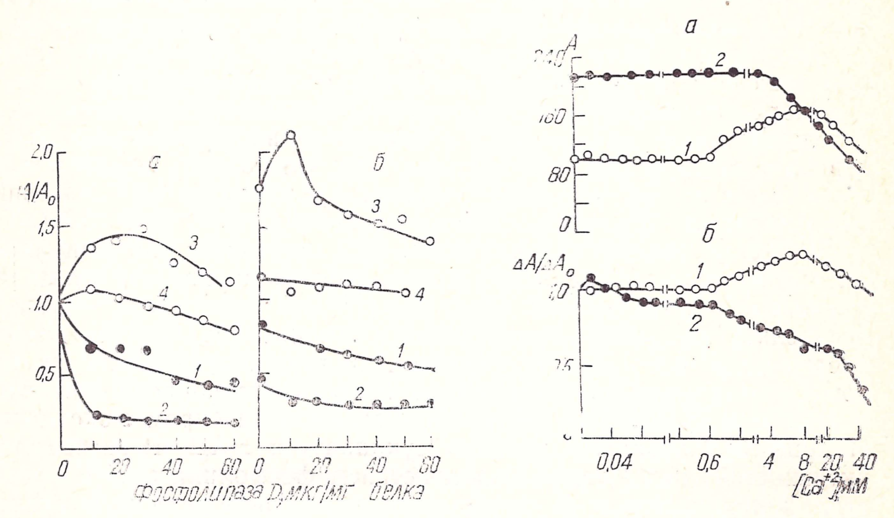



Рис. 9. Окисление НАД·Н и сукцината митохондриями в присутствии фосфолипазы *D*.

*а* — без ионов $Ca^{+2}$, *б* — с 50 мМ $CaCl_2$; *1*, *2* — сукцинат, *3*,*4* — НАД·Н. Время инкубации 30 мин (*1*, *3*) и 60 мин (*2*, *4*) при 20°С.

Рис. 10. Влияние $[Ca^{+2}]$ на НАД·Н и сукцинатоксидазу.

*а* — удельная активность, *б* — прирост активности при добавлении цитохрома **с**; *1* — НАД·Н-оксидаза, *2* — сукцинатоксидаза.

концентраций практически не оказывает влияния, а при концентрациях от 4 до 50 мМ наблюдается небольшое увеличение ΔA. Важно отметить, что активность полиферментных систем митохондрий и процесс включения цитохрома **с** после введения $Ca^{+2}$ развиваются во времени. Так, в течение 30 мин прирост сукцинатоксидазной активности, вызываемый добавлением цитохрома **с**, повышается в 3 раза, а более длительная инкубация митохондрий сопровождается потерей способности их мембран связывать цитохром **с**.

Фосфолипаза *D* разрушает участки мембран, способные включать цитохром **с**. Ионы $Ca^{+2}$ повышают каталитическую активность фосфолипазы *D* в начальный период инкубации, а затем

фосфолипаза *D* перестает действовать на процесс включения цитохрома **c**. С другой стороны, по мере увеличения времени инкубации с фосфолипазой *D* интенсивность расщепления участков, ответственных за включение цитохрома **c**, становится более чувствительной к ионам кальция. При небольшой продолжительности инкубации низкие концентрации $Ca^{+2}$ (2—5 м*М*) предохраняют эти участки от действия фосфолипазы *D*, однако те же участки мембран митохондрий, подвергавшихся длительной тепловой деградации, расщепляются фосфолипазой *D* при любых концентрациях $Ca^{+2}$, особенно при высоких (30 м*М*). В этом отношении наблюдается аналогия с действием фосфолипазы *D* на структурно неорганизованные системы фосфолипидов в опытах in vitro (см. выше), когда оптимальная концентрация $Ca^{+2}$ составляла 30—50 м*М*.

В митохондриях НАД.Н. окисляется кислородом двумя независимыми путями, каждый из которых является цитохром **c**-зависимым. Один из этих путей окисления ингибируется ротеноном (внутренний путь окисления). На рис. 11 представлены результаты раздельного определения скоростей окисления НАД.Н по внутреннему и внешнему путям с различными концентрациями $Ca^{+2}$, а также влияние фосфолипазы на процесс термодеградации. Видно, что при инкубации митохондрий при 20° их НАД. Н-оксидазная активность несколько повышается, а затем происходит медленная инактивация этой полиферментной системы. Если проводить измерения в присутствии ротенона, аналогичные зависимости носят иной характер: НАД.Н-оксидазная активность постепенно повышается по мере инкубации. Такие же зависимости с 2 м*М* $CaCl_2$ отличаются лишь тем, что возрастание скорости окисления по внешнему пути становится более интенсивным, а внутренний путь окисления нарушается в большей степени, после того как достигается экстремальное значение скорости окисления НАД.Н. Увеличение количества $CaCl_2$ до 30 м*М* вызывает противоположный эффект: фаза активации сохраняется, скорость инактивации снижается. При этом активация процесса окисления НАД.Н по внешнему пути становится более значительной. Характер кривых практически не изменяется в том случае, если указанные эксперименты провести в присутствии фосфолипазы *D*. Без ионов $Ca^{+2}$ фосфолипаза *D* несколько усиливает активацию по внешнему пути окисления на начальном участке кривой, но затем наблюдается медленная инактивация.

При рассмотрении окисления по внутреннему пути видно, что фосфолипаза *D* в отсутствие $Ca^{+2}$ увеличивает скорость активации дыхательной цепи и последующей ее инактивации. В присутствии 2 м*М* $CaCl_2$ фаза активации исчезает и происходит интенсивная потеря митохондриями способности окислять НАД.Н по внутреннему пути. Процессы активации, вызываемые инкубацией митохондрий с ионами кальция, в основном происходят за счет изменения скорости окисления НАД.Н по внешнему пути, а место действия деградативных процессов — внутренний путь окисления

НАД.Н в митохондриях. Таким образом, фосфолипаза *D*, не изменяя существенно характера процессов деградации, ускоряет их.

Тепловая денатурация сукцинатоксидазы с 2 м*М* $CaCl_2$ протекает в 2 этапа (рис. 12): на первом происходит относительно быстрая инактивация до 40% от первоначальной активности, а оставшийся уровень сукцинатоксидазной активности практически не изменяется, и лишь после 2,5 ч наступает инактивация. В присутствии 30 м*М* $CaCl_2$ инактивация на первом этапе происходит быстрее, а на втором замедляется. Ионы кальция при низкой

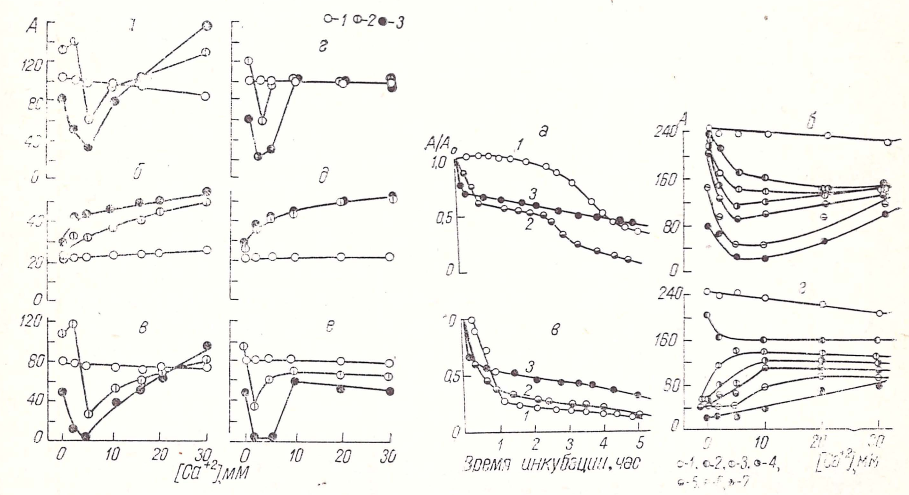



Рис. 11. Действие фосфолипазы *D* на активность НАД·Н-оксидазы митохондрий при различных концентрациях ионов кальция.

*а, г*—без добавок, *б д*—с 2 мкг ротенона, *в, е*—разница между „*а*“ („*г*“) и „*б*“ („*д*“); *1*—до начала инкубации, *2*—через 1 ч, *3*—3, ч, *а, б, в*—без фосфолипазы, *г, д, е*—с фосфолипазой.

Рис. 12. Действие фосфолипазы на активность сукцинатоксидазы митохондрий.

*а, в*—изменение скорости окисления сукцината при инкубации митохондрий при 20°C, *1*—без ионов $Ca^{+2}$ , *2*—с 2 м*М* $CaCl_2$, *2*—с 30 м*М* $CaCl_2$; *б, г*—влияние инкубации митохондрий на характер зависимости активности сукцинатоксидазы от $[CaCl_2]$, *1*—5 мин инкубации при 20°C, *2*—20 мин, *3*—1 ч, *4*—2 ч, *5*—3 ч, *6*—4 ч, *7*—5 ч; *а, б* - без фосфолипазы; *в, г*—с фосфолипазой.

концентрации (2—10 м*М*) дестабилизируют сукцинатоксидазную систему, с увеличением же концентрации выше 10—15 м*М* снижают степень деградации. В присутствии фосфолипазы *D* инактивация без $CaCl_2$ ускоряется; то же происходит и при наличии в среде 2 или 30 м*М* $CaCl_2$, но на начальном участке кривой. Фермент активируется малыми концентрациями $Ca^{+2}$, а высокие дозы $Ca^{+2}$ снимают литический эффект фосфолипазы *D*.

На основании приведенных результатов можно сделать следующие выводы.

Низкие концентрации $Ca^{+2}$ не изменяют способности цитохрома *с* включаться в мембраны митохондрий, не подвергавшихся тепловому воздействию. Более высокие концентрации способст-

вуют лучшему включению цитохрома **с**, что, по-видимому, связано с действием эндогенных фосфолипаз на мембраны митохондрий. Экзогенные фосфолипазы $A_2$ и $D$ также способствуют включению цитохрома **с**.

Инкубация митохондрий при 20° вызывает потерю ими способности включать цитохром **с**. Ионы $Ca^{+2}$ предохраняют митохондрии от деградации, приводящей к потере способности включения цитохрома **с**.

Расщепление фосфолипидов мембран митохондрий обусловливает потерю ими способности включать цитохром **с** как в присутствии, так и в отсутствии ионов кальция. Включение в НАД.Н-оксидазную систему в отсутствии $Ca^{+2}$ теряется не полностью, а включение в сукцинатоксидазную систему — практически до конца.

Параллельно с потерей митохондриями способности включать цитохром **с** падает способность митохондриальных мембран связываться с экзогенными фосфолипазами, вследствие чего длительная инкубация митохондрий с фосфолипазами сопровождается «самоингибированием», что при высоких концентрациях $Ca^{+2}$ выражается в ложной стабилизации полиферментных систем.

Различные фрагменты цепи переноса электронов обладают неодинаковой чувствительностью к модификации химической структуры фосфолипидов. Так, для сукционатоксидазной и НАД.Н-оксидазной цепи важна целостность всей фосфолипидной молекулы: отщепление спиртового остатка (фосфолипаза $D$), фосфатной группировки со спиртовым остатком (фосфолипаза С) или жирнокислотного остатка (фосфолипаза $A_2$) в одинаковой степени приводят к ингибированию функции переноса электронов от указанных субстратов к молекулярному кислороду (Рахимов и др., 1981). Меньшая подверженность деградации НАД.Н-оксидазной функции по сравнению с сукцинатоксидазной объясняется тем, что НАД.Н окисляется митохондриями по внешнему и внутреннему путям. Действительно, ротенончувствительный (внутренний) путь окисления ингибируется фосфолипазой $A_2$, а скорость переноса электронов по ротеноннечувствительному пути окисления при ограниченном гидролизе фосфолипидов возрастает, так как при этом увеличивается скорость наиболее медленной стадии — перенос электронов через цитохром $b_5$.

Для цитохром **с**-оксидазы важно наличие в молекулах фосфолипидов именно фосфатной группировки, так как при действии фосфолипазы $A_2$ и фосфолипазы $D$ активность цитохром **с**-оксидазы не уменьшается, а фосфолипаза С приводит к ее инактивации. Повышение активности, наблюдаемое в некоторых экспериментах, связано с условиями измерения активности, так как при ограниченном гидролизе фосфолипидов улучшается включение и диффузия цитохрома **с** в мембранах митохондрий.

Образование комплексов типа фосфолипаза-Са-фосфолипид является одним из необходимых условий для взаимодействия этих

макромолекул с биологическими мембранами. Не исключено, что в таком комплексообразовании участвуют и некоторые другие компоненты самих мембран.

Из экспериментального материала, приведенного выше, следует, что в настоящее время уже имеются данные, которые позволяют решить некоторые вопросы общих проблем мембранного катализа, в частности экспериментального обоснования возможности регуляции скорости протекания ферментативных процессов путем изменений фазовых состояний нерастворимых субстратов.

Среди полученных результатов, которые имеют общий характер и представляют ценность при решении вопросов мембранного катализа, необходимо выделить данные по активации фосфолипаз на поверхности твердой фазы и возможности функционирования фермента в водно-органической среде, по поведению фосфолипаз в мембранных и модельных системах.

Специфическая локализация ферментов на границе раздела фаз, точнее, на молекулах субстрата, образующих структурированные фосфолипидные комплексы или мембраны, является необходимым этапом осуществления ферментативного процесса, в котором могут участвовать и ионы кальция. Высокая скорость реакции и избирательность в отношении состояния субстрата, достигаемые в системах с развитой границей раздела фаз, свидетельствуют о комплементарности фермент-субстратных взаимодействий. При гомогенном ферментативном катализе условие комплементарности предусматривает соответствие связывающего и каталитического участков активного центра фермента и химической структуры субстрата. При рассмотрении гетерогенных ферментативных реакций решающими являются первые стадии процесса, когда происходит взаимодействие водорастворимого фермента с поверхностью нерастворимой субстратной фазы или, напротив, адсорбция и проникновение водорастворимого субстрата в водонерастворимую фазу, в которой локализован фермент.

Можно предположить, что требование комплементарности в случае липолитических ферментов предусматривает не только соответствие химической структуры субстрата и участков активного центра фермента, но и соответствие струкуры фермента и поверхности субстратной фазы. Действительно, в составе молекул, липаз и фосфолипаз обнаружены специальные участки («контактные группы», «якорный центр», «центр узнавания межфазной поверхности», «адсорбционный участок»), ответственные за «узнавание» состояния поверхности субстратной фазы, которые пространственно отделены от связывающего и каталитического участков активного центра. Таким образом, требование комплементарности предполагает возможность регуляции каталитической активности ферментов, функционирующих в гетерогенных условиях, с одной стороны — путем изменения структуры фермента, а с другой — путем изменения фазового состояния субстрата.

Состояние субстратной фазы при всех прочих равных условиях — один из наиболее важных факторов, определяющих ос-

Таблица 3

**Некоторые параметры реакции гидролиза лецитина, катализируемой фосфолипазой *D* (Мадьяров, 1977)**

| Активатор | Субстрат и его состояние | Удельная активность, ед/мг | Концентрация ионов кальция, мМ | pH-оптимум | Температурный оптимум |
|---|---|---|---|---|---|
| Диэтиловый эфир | Лецитин, ламелярное состояние | 0,7 | 60—100 | 5,6 при 26°<br>5,0 и 6,0 при 30° | * |
| Этилацетат | „ | 0,34 | 50 | 5,5 при 30°<br>6,4 при 45° | * |
| Нитробензол | „ | 2,0 | 50 | 5,5 при 30° и 45° | * |
| Бензол | „ | 1,36 | 50 | 5,5 и 7,0 при 30° и 45° | * |
| DDC | Лецитин, смешанные мицеллы | 3,7 | 40 | 6,4 при 30°<br>5,6 и 7,2 при 45° | 45° |
| Силикагель | Лецитин, адсорбционно-иммобилизованный | 2,2 | 20 | 5,6 7,5 при 30° и 45° | 30° при pH 5,6 |
| | | 1,4 | 0 | 5,7 и 7,0 | 45° при pH 7,5 |
| Без активатора | Лецитин, липосомы, обработанные ультразвуком | — | 8 | 5,6 и 7,2 при 30° | — |
| | Фосфолипиды, БФМ | — | 4 | 5 6 и 7,4 при 30° | — |
| | Фосфолипиды, мембраны митохондрий | — | 2 | 6,0 | 36° |
| | Фосфолипиды, мембраны микросом | — | Ингибитор | 7,2 | — |

* Температурный оптимум не определен из-за летучести активаторов.

новные параметры ферментативной реакции (табл. 3). Скорость реакции зависит от состояния субстрата, например, в присутствии различных органических растворителей, при обработке суспензии ультразвуком, додецилсульфатом натрия или при адсорбции на поверхности твердой фазы и локализации в мембранах конкретных типов (бислои, мембраны микросом и митохондрий). Все показатели ферментативной реакции зависят от факторов, контролирующих физическое состояние субстрата: размер и кривизну поверхности липосом, локализацию и ориентацию молекул субстрата, а также их подвижность и поверхностную концентрацию на границе раздела фаз.

## ЛИТЕРАТУРА


Джанбаева Н. Р., Рахимов М. М., Юлдашев П. Х. 1972. ХПС, № 2, 222.

Джанбаева Н. Р. 1976. «Биохимия», **41**, 114.

Землянская Н. Р. 1979. Исследование некоторых свойств щелочных липаз в растворимом и иммобилизованном состояниях. Автореф. канд. дис. М.

Календарёва Т. И., Рашидова С. Ш., Рахимов М. М. 1978. «Узб. хим. журн.», № 5, 36.

Кхолэ В. и др. 1980. ДАН УзССР, № 2, 57.

Мадьяров Ш. Р. 1976. «Биохимия», **41**, 255.

Мадьяров Ш. Р., Рахимов М. М. 1977. «Узб. биол. журн.», № 1, 7.

Мадьяров Ш. Р. 1977. Изучение действия фосфолипазы D на границе раздела фаз. Автореф. канд. дис. Ташкент.

Мирсалихова Н. М., Рахимов М. М. 1977. ДАН СССР. **233**, 981.

Полторак О. М., Чухрай Е. С. 1970. «Вестник МГУ», сер. хим., **41**, 133.

Полторак О. М., Чухрай Е. С. 1971. Физико-химические основы ферментативного катализа. М.

Рахимов М. М. и др. 1970. ХПС, № 6, 738.

Рахимов М. М. и др. 1972. ХПС, № 2, 228.

Рахимов М. М., Мадьяров Ш. Р., Абдумаликов А. Х. 1976а. «Биохимия», **41**, 452.

Рахимов М. М., Джанбаева Н. Р., Абдумаликов А. Х. 1976б. «Биохимия», **41**, 289.

Рахимов М. М., Мадьяров Ш. Р., Абдумаликов А. Х. 1976в. «Прикл. биохим. и микробиол.», **12**, 30.

Рахимов М. М. и др. 1976 г. «Узб. биол. журн.», № 1, 7.

Рахимов М. М., Мадьяров Ш. Р., Абдумаликов А. Х. 1976д. «Биохимия», **41**, 569.

Рахимов М. М., Мадьяров Ш. Р 1977а. «Биохимия», **42**, 622.

Рахимов М. М., Джанбаева Н. Р., 1977б. «Биохимия» **42**, 971.

Рахимов М. М., Алматов К. Т. 1977в. «Биохимия», **42**, 1852.

Рахимов М. М. и др. 1978. «Биохимия», **43**, 433.

Рахимов М. М. и др. 1981. «Биохимия», **46**, № 2.

Рэкер Э. 1979. Биоэнергетические механизмы: новые взгляды. М.

Туйчибаев М. У. и др. 1977. «Биохимия», **42**, 2160.

Acker L., Diemair W., Jager R. 1952. Biochem. Z., **322**, 472.

Allgyer T. T., Wells M. A. 1979, Biochemistry, **18**, 5348.

Antia N. J., Bilinsky E., Lau J. C. 1970. Canad. J. Biochem, **48**, 643.

Banham A. D., Dawson R. M. S. 1959. Biochem, J. 72, 486.

Beare J. L., Kates M., 1967. Canad. J. Biochem, **45**, 101.

Bensonana G., Desnuelle P. 1965. Biochim. et Biophys. acta, **105**, 121.

Brockerhoff H. 1969. Arch. Biochem. Biophys., **134**, 366.

Brockerhoff H. 1973. Chem. Phys. Lipids, **10**, 215.

Brockerhoff H. 1974. Bioorg. Chem., 3, 176.
Brockerhoff H., Jensen R. G. 1974. Lipolitic Enzymes. Acad. Press. New. York. San Francisco, London.
Burstein C., Layter A., Racker E. 1971. J. Biol. Chem., **246**, 4075.
Chen J.-Sh., Barton P. G. 1971. Can. J. Biochem., **49**, 1362,
Cole R., Benns C., Proulx P. 1974 Biochim. et Biophys Acta, **337**, 325.
Comes P., Kleinig H. 1973. Biochim. et Biophys. Acta, **316**, 13.
Davidson F. M., Long C. 1958. Biochem. J., 69, 458.
Dawson R. M. C., Hemington N. 1967. Biochem. J., **102**, 76.
Desnuelle P. 1972. «The Enzymes», ed. Boyer, P. D., New York, London, 7, 575.
Dharmalingam K., Jayaraman J. J. 1972. Biochem. J., **128**, 45 p.
Doy O., Nojima Sh. 1971. Biochim. et Biophys. Acta, **248**, 234.
Duset G. 1949. Ann. agron., **19**, 184.
Einset E., Clark W. L. 1958. J. Biol. Chem., **213**, 703.
Fourcans B., Jain M. K. 1974. Adv. Lipid. Res., **12**, 147.
Fung C. K., Proulx P. 1969. Canad. J. Biochem., **47**, 371
Gallai-Hatchard J. J., Thompson R. H. S., 1965. Biochim. et Biophys. Acta, **98**, 128.
Garner C. W., Smith L. C. 1970. Biochim. Biophys. Res. Communs., **39**, 672.
Gatt Sh., Barenholz Y. 1973. Ann. Rev. Biochem., **42**, 61.
De Hass G. H. et al. 1968. Biochim. et Biophys. Acta, **248**, 197.
Hanahan D. J., Chaikoff I. L. 1947a. J. Biol. Chem., **168**, 233.
Hanahan D. J., Chaikoff I. L. 1947b. J. Biol. Chem. **169**, 699.
Hanahan D. J. 1952. J. Biol. Chem., **195**, 199.
Hanahan D. J. 1971. «The Enzymes», ed Boyer P. D., Acad. Press, New York, London, **5**, 71.
Hayaishi O., Cornberg. 1954. J. Biol. Chem., **206**, 647.
Heller M., Aladiem E., Shapiro B. 1968. Bull. Soc. Chim. Biol. 50, 1395.
Heller M., Mozes N., Maes E. 1975. Methods in Enzymology, 35, 226.
Imamura S., Horiuti Y. 1979. Biochem., **85**, 79.
Jacobson K., Papahadjopoulos D. 1975. Biochemistry, **14**, 152.
Jain M. K., Cordes E. H. 1973. J. Membrane Biol., **14**, 119.
Kanfer L. A., Goetzl E. J., Austen K. F. 1976, J. Clin. Invest., **57**, 1173.
Kates M. 1953. Nature, **172**, 814.
Kates M. 1954. Canad. J. Biochem. Physiol., **32**, 571.
Kates M. 1955. Canad. J. Biochem. Physiol., **33**, 575.
Kates M. 1960. «Lipid Metabolism», ed. K. Bioch., Wiley, New York, 165.
Kleinman J. H., Lands W. E. M. 1969. Biochim. et Biophys. Acta, **187**, 477.
Long C., Odavic R., Sargent E. J., 1967 a. Biochem. J. **102**, 216.
Long C., Odavic R., Sargent E. J. 1967 b. Biochem. J., **102**, 221.
Lowenstein J. M. ed. 1969. «Methods in Enzymology», **14**, 133.
Natter L. J., Privet O. S. 1966. «Lipids», **1**, 258.
Okawa Y., Yamaguchi T., 1975. J. Biochem., **78**, 363.
Okuda H., Fujii S., 1968, J. Biochem., **64**, 377.
Okuda H., Fujii S. 1969, Shikoki. Acta Med., **25**, 192.
Ono J., Nojima Sh. 1969 a. Biochim. et Biophys. Acta, **176**, 111.
Ono J., Nojima Sh. 1969 b. Biochim. et Biophys. Acta, **176**, 120.
Ono J., White D., 1970. Bacter J. 103, 111.
Op den Kamp J. A. F., De Gier J., Van Deenen L. L. M. 1974. Biochim. et Biophys. Acta, 345, 253.
Ory R. L., et al. 1967. Canad. J. Biochem. **45**, 1445.
Papahadjoupoulos D. et al. 1973. Biochim. et Biophys. Acta, **311**, 330.
Pasten J., Macchia V., Katren R., 1968. J. Biol. Chem., **243**, 3750.
Pieterson W. A. et al. 1974. Biochemistry, **13**, 1455.
Pieterson W. A., Ph. D. Thesis. 1973. Ri jksuniversitat, Utrecht, The Netherlands.
Quarles R. H., Dawson R. M. C. 1969 a. Biochem. J., **112**, 787.
Quarles R H., Dawson R. M. C. 1969 b. Biochem. J., 113, 697.
Raybin D. M., Bertsch L. L., Kornberg A. 1972. Biochemistry, **11**, 1754.

Rose W. G. 1950. Food. Tecnol., **4**, 230.
Rosental A. F., Shing-Hsien Han S. 1971. Biochim. et Biophys. Acta. **218**, 213.
Roughan R. G., Slack C. R., 1976. Biochim. et Biophys. Acta, **431**, 86.
Saito M., Kanfer J. 1973. Bioch. Bioph. Res. Communs., **53**, 321.
Saito M., Bourque E., Kanfer J. 1974. Arch. Biochem. Biophys., 164, 420.
Saito M., Kanfer J. 1975 a. Arch. Biochem. Biophys. **169**, 318.
Saito M., Bourque E., Kanfer J. 1975 b. Arch. Biochem. Biophys., **169**, 304.
Scandella C. J. Kornberg A. 1971. Biochemistry, **10**, 4447.
Scherphof G. L., Van Deenen L. L. M. 1965. Biochim. et Biophys. Acta, **98**, 204.
Semeriva M., Desnuelle P. 1976. Horisons. Biochem. Biohys., **2**, 32.
Smith R. H. 1954. Biochem. J., **56**, 240.
Soucek A., Michales C., Souckova A. 1971. Biochim. et Biophys. Acta, **227**, 116.
Slotboom A. J. et al. 1978. Enzymes Lipid Metab. Proc. Colleg. Strasbourg (1977). 137.
Taki T., Matsumoto M. 1973. Jap. J. Exp. Med., **43**, 219.
Talwalkar R. T., Gard N. K., Krishna—Murti C. R. Indian J. Biochem. 6, 228
Tan K. H., Lowien R. 1972, J. Biol. Chem., **247**, 3273.
Tookey H. L., Balls A. K. 1956. J. Biol. Chem., **218**, 213
Van Deenen L. L. M., De Haas G. H. 1966. Ann. Rev. Biochem., 35, 157.
Van Den Bosch H., Aarsman A. J., Van Deenen L. L. M. 1974. Biochim. et Biophys. Acta, **248**, 197.
Van Den Bosch H. 1974. Ann. Rev. Biochem., **43**, 243.
Verger R., Mieras M. C., De Haas G. H. 1973. J. Biol. Chem., **248**, 4023.
Waite M., Sisson P. 1971. Biochemistry, **10**, 2377.
Weis H., Spiegel E., Titus E. 1959. Nature. London, 183, 1493.
Wells M. A., Hanahan D. J. 1969. Biochemistry, **8**, 414.
Wells M. A. 1974. Biochemistry, **13**, 2248.
Wu T. W., Tinker D. O., 1969. Biochemistry, **8**, 1558.
Wykle R. L., Schraemmer J. M. 1974. J. Biol. Chem., **249**, 1742.
Wykle R. L., Kraemer W. F., Schraemmer Y. M. 1980. Biochim. et Biophys. Acta, **619**, 57.
Yabusaki K., Wells M. A. 1975. Biochemistry, **14**, 162.
Zografi G., Verger R., De Haas G. H. 1971. Chem. Phys. Lipids, 7, 185.

## СОДЕРЖАНИЕ

ТРАНСПОРТ ИОНОВ ЧЕРЕЗ БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

*Утверждено к печати Ученым советом Института биохимии, Отделением биологических наук АН УзССР*

Редактор *Т. А. Шур*
Художник *А. М. Расулев*
Технический редактор *В. М. Тарахович*
Корректор *Т. В. Кормушина*

ИБ № 1675

Сдано в набор 23.07.82. Подписано к печати 21.09.82. Р05339. Формат 60×90[1]/16. Бумага типографская № 1. Гарнитура литературная. Печать высокая. Усл. печ. л. 14,5. Уч.-изд. л. 15,1. Тираж 1000. Заказ 156. Цена 2 р. 40 к.

Адрес Издательства: 700047. Ташкент, ул. Гоголя, 70.
Типография Издательства «Фан» УзССР, Ташкент, проспект М. Горького, 79.



Цена 2р. 40к.



Транспорт ионов